	GESTIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS Y BIBLIOTECARIOS		CÓDIGO	FO-GS-15	
			VERSIÓN	02	
	ESQUEMA HOJA DE RESUMEN			FECHA	03/04/2017
				PÁGINA	1 de 1
ELABORÓ		REVISÓ	APROBÓ		
Jefe División de Biblioteca		Equipo Operativo de Calidad	Líder de Calidad		

RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES): NOMBRES Y APELLIDOS COMPLETOS

NOMBRE(S): KELLY VALENTINA APELLIDOS: ALVARADO VEGA

NOMBRE(S): DIANA CAROLINA APELLIDOS: PARADA RINCÓN

NOMBRE(S): NATALIA APELLIDOS: SEPULVEDA CONTRERAS

FACULTAD: FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR:

NOMBRE(S): LAURA YOLIMA APELLIDOS: MORENO ROZO

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): BACTERIAS HIDROCARBONOCLASTAS Y SU POTENCIAL BIOSURFACTANTE EN LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS: ERA ANTROPOGÉNICA, PANORÁMICA Y DESAFÍOS NACIONALES.

El petróleo es la principal fuente energética del mundo, pero al ocurrir derrames, fugas o una inadecuada extracción y purificación por la industria petrolera se convierte en uno de los mayores contaminantes del planeta, provocando efectos negativos sobre el medio ambiente, representando un riesgo para la salud pública al expandirse en suelos y fuentes hídricas. No obstante, las bacterias hidrocarbonoclastas son capaces de tolerar y/o asimilar los hidrocarburos como fuente de carbono y energía al emplear mecanismos de adaptación como la producción de biosurfactantes que surgen como alternativa para biorremediar ecosistemas en los cuales el hombre con sus actividades diarias contribuye al deterioro de los recursos naturales. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo de investigación consistió en analizar el potencial biosurfactante de bacterias hidrocarbonoclastas en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos teniendo en cuenta la panorámica y los desafíos nacionales. Se evidencio que las bacterias hidrocarbonoclastas son una alternativa atractiva en procesos como la biorremediación de suelos, garantizando la conservación de la biodiversidad y aumentando la resiliencia natural de los suelos afectados por derrames de petróleo; donde los géneros bacterianos más representativos son *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. debido a su gran diversidad metabólica.

PALABRAS CLAVES: Contaminante, Hidrocarburos, Derrames, Microorganismos, Medio ambiente.

CARACTERÍSTICAS:

PÁGINAS: 157

PLANOS: 0

ILUSTRACIONES: 26

CD ROOM: 0

BACTERIAS HIDROCARBONOCLASTAS Y SU POTENCIAL BIOSURFACTANTE EN
LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS: ERA ANTROPOGÉNICA, PANORÁMICA Y
DESAFÍOS NACIONALES

KELLY VALENTINA ALVARADO VEGA
NATALIA SEPÚLVEDA CONTRERAS
DIANA CAROLINA PARADA RINCÓN

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
CÚCUTA
2022

BACTERIAS HIDROCARBONOCLASTAS Y SU POTENCIAL BIOSURFACTANTE EN
LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS: ERA ANTROPOGÉNICA, PANORÁMICA Y
DESAFÍOS NACIONALES

KELLY VALENTINA ALVARADO VEGA
NATALIA SEPÚLVEDA CONTRERAS
DIANA CAROLINA PARADA RINCÓN

Trabajo de Grado modalidad Monografía presentado como requisito para optar por el título de
Ingeniero (a) Biotecnológico (s)

Directores:

PhD. LAURA YOLIMA MORENO ROZO

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
CÚCUTA

2022

ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 15 septiembre de 2022

HORA: 08:00 A.M.

LUGAR: CUCUTA, NORTE DE SANTANDER

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TITULO: "BACTERIAS HIDROCARBONOCLASTAS Y SU POTENCIAL BIOSURFACTANTE EN LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS: ERA ANTROPOGÉNICA, PANORÁMICA Y DESAFÍOS NACIONALES."

MODALIDAD: MONOGRAFIA

JURADO
EDWIN JAVIER DUARTE GÓMEZ
AZULA SANGUINO QUINTERO
GERMAN LUCIANO LOPEZ BARRERA

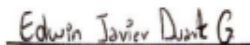
ENTIDAD: UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER

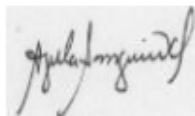
DIRECTOR: LAURA YOLIMA MORENO ROZO

NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
Kelly Valentina Alvarado Vega	1611414	4.4
Diana Carolina Parada Rincón	1611401	4.4
Natalia Sepúlveda Contreras	1611433	4.4

OBSERVACIONES: APROBADO.

FIRMA DE LOS JURADOS


Edwin Javier Duarte G

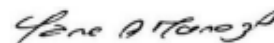




Edwin Javier Duarte Gómez

Azula Sanguino Quintero

German Luciano López Barrera



Vo. Bo Coordinador Comité Curricular _____

Agradecimientos

Agradecemos inicialmente a nuestros familiares y amigos quienes fueron esas voces de ánimo en momentos difíciles que nos permitieron llegar hasta este punto de nuestra carrera universitaria; además, damos gracias a Dios por permitirnos tener la capacidad de desarrollar el presente trabajo investigativo con cabalidad a los objetivos planteados.

Así mismo, nos sentimos agradecidas con la Universidad Francisco de Paula Santander por brindarnos los conocimientos necesarios durante estos diez semestres y, por formarnos como profesionales competentes ante los desafíos que nos enfrentamos día a día; por otro lado a la Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente y específicamente al Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas (MAJUMBA) por darnos las habilidades básicas de laboratorio en el momento en que fue posible y, por permitirnos conocer personas muy especiales y solidarias como Camilo, Paola, Sheby y Sandra.

Por último, pero no menos importante queremos dar gracias a nuestra tutora y profesora la Ph.D. Laura Yolima Moreno Rozo quien continuamente nos enseñó el camino que debíamos seguir en la realización de esta Monografía de la manera más cariñosa y respetuosa posible. También agradecemos a nuestra cátedra de maestros por cada enseñanza brindada que nos contribuyó a ser los profesionales que somos ahora.

Este logro es también para ustedes.

Tabla De Contenido

Introducción	16
1. Descripción del problema	17
1.1. Objetivos	17
<i>1.1.1. Objetivo General.</i>	17
<i>1.1.2. Objetivos Específicos.</i>	17
1.2. Planteamiento del Problema	18
1.3. Formulación del Problema	20
1.4. Justificación	20
2. Referentes Teóricos	23
2.1. Antecedentes de la Investigación	23
2.2. Marco Teórico	25
<i>2.2.1. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos</i>	25
<i>2.2.2. Bacterias Hidrocarbonoclastas y su Potencial en la Producción de</i> <i>Biosurfactantes</i>	36
<i>2.2.3. Era antropogénica: problemática actual</i>	45
2.3. Marco Legal	47
3. Metodología	57
3.1. Tipo de Investigación	57
3.2. Método de Investigación	57
<i>3.2.1. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos</i>	57
<i>3.2.2. Técnicas para la Presentación de Datos, Tablas y Gráficos Estadísticos.</i>	58
<i>3.2.3. Fuentes de Información.</i>	58

3.3. Hipótesis	59
4. Obtención de Bacterias con Potencial Biosurfactante Empleadas en Procesos de Biorremediación en Suelos	60
4.1. Muestreo y Caracterización de la Zona Afectada	60
4.1.1. Toma de Muestra en Suelos Contaminados con Hidrocarburos	63
4.2. Aislamiento de Microorganismos Presentes en Suelos Contaminados con Hidrocarburos	65
4.2.1. Técnica de Enriquecimiento	66
4.2.2. Técnica por Diluciones	68
4.3. Purificación Y Obtención De Microorganismos Presentes En Suelos Contaminados Con Hidrocarburos	68
4.3.1. Identificación Macroscópica, Microscópica y Bioquímica	69
4.4. Caracterización de aislados bacterianos y suelos contaminados con hidrocarburos	70
5. Bacterias Hidrocarbonoclastas: Actividad Biosurfactante, Protocolos en la Caracterización Molecular y Secuenciación	77
5.1. Técnicas Aplicadas en la Identificación de la Actividad Biosurfactante	77
5.1.1. Pruebas Cualitativas	78
5.1.2. Pruebas Cuantitativas	83
5.2. Evaluación de la Capacidad de Biodegradación del Hidrocarburo	86
5.2.1. Determinación de Hidrocarburos Totales	86
5.2.2. Biodisponibilidad del Hidrocarburo	87
5.2.3. Degradación del Hidrocarburo	88

5.3. Caracterización molecular y secuenciación de cepas bacterianas con actividad biosurfactante.	90
5.3.1. <i>Protocolos de Extracción, Cebadores Empleados, Ciclo de PCR y Secuenciación del ADN para la Identificación de Bacterias Hidrocarbonoclastas</i>	90
5.3.2. <i>Identificación Molecular de Enzimas Implicadas en la Actividad Biosurfactante</i>	97
5.4. Identificación de Aislados Bacterianos con Producción de Moléculas Biosurfactantes.	98
6. Aportes y Desafíos de las Bacterias Hidrocarbonoclastas en la Presente Era Antropogénica	109
6.1. Contaminación e Impactos en el Suelo por Derrames de Hidrocarburos	109
6.2. Perspectiva Nacional e Internacional	111
6.3. Aprovechamiento de las Bacterias Hidrocarbonoclastas	115
6.4. Papel de las bacterias hidrocarbonoclastas frente a los agentes contaminantes derivados de la actividad antropogénica	119
7. Conclusiones	129
8. Referencias	131
9. Anexos	151

Lista De Tablas

Tabla 1. Principales ventajas y desventajas de la Biorremediación	29
Tabla 2. Principales ventajas y aspectos a tener en cuenta en la bioaugmentación.	31
Tabla 3. Principales ventajas y desventajas en la bioaireación.	31
Tabla 4. Principales ventajas, desventajas y aspectos a tener en cuenta en la Técnica de Inyección de aire a presión.	32
Tabla 5. Principales ventajas y aspectos a tener en cuenta en la bioestimulación.	33
Tabla 6. Principales ventajas, desventajas y aspectos a tener en cuenta en la técnica Landfarming.	34
Tabla 7. Principales ventajas, desventajas y aspectos a tener en cuenta en la técnica bioceldas.	35
Tabla 8. Principales ventajas y desventajas en el tratamiento de biosuspensión	36
Tabla 9. Propiedades de las moléculas biosurfactantes.	43
Tabla 10. Bacterias productoras de biosurfactantes.	43
Tabla 11. Parámetros permisibles de los metales e hidrocarburos totales de petróleo (TPH).	50
Tabla 12. Normativa internacional sobre tensoactivos y medio ambiente.	51
Tabla 13. Principales normas implementadas en Colombia para el mantenimiento y protección del recurso suelo.	52
Tabla 14. Parámetros para la calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados.	53
Tabla 15. Cantidad de Muestra Requerida Según el Análisis a Realizar	62

Tabla 16. Resultados Preliminares para la Identificación de Bacterias con Capacidad de Tolerar Hidrocarburos	75
Tabla 17. Criterios Para el Reporte de Resultados en la Prueba de Actividad Hemolítica	79
Tabla 18. Reporte de Resultados en la Prueba de Actividad Emulsificante	85
Tabla 19. Reporte de Resultados para la Adsorción de Hidrocarburos por las Células Bacterianas	89
Tabla 20. Métodos de Extracción del ADN y Cebadores Empleados en la Identificación de Bacterias Hidrocarbonoclastas	90
Tabla 21. Protocolos Empleados para la Amplificación y Secuenciación del ADN de Bacterias con Actividad Biosurfactante	91
Tabla 22. Propiedades de las Moléculas Biosurfactantes	99
Tabla 23. Derrames de Petróleo y su Nivel de Afectación en los Municipios de Nariño y Putumayo en 2015 a 2019	113
Tabla 24. Vertimientos de Hidrocarburos en Distintas Provincias del Departamento de Amazonas Pertenecientes a Perú en 2011 a 2016	114
Tabla 25. Aspectos Relevantes que Presentan los Microorganismos Hidrocarbonoclastas	116
Tabla 26. Principales Bacterias Productoras de Biosurfactantes	117
Tabla 27. Derrames de Hidrocarburos Generados en los Últimos Años Debido a Atentados Terroristas	122
Tabla 28. Fallas en el Oleoducto Caño Limón-Coveñas a su Paso por Norte de Santander Durante el Segundo Semestre de 2018	123
Tabla 29. Investigaciones Realizadas Sobre las Principales Problemáticas Asociadas a los Hidrocarburos en Norte de Santander	124

Tabla 30. Principales Géneros Bacterianos Encontrados en Áreas Contaminadas con
Hidrocarburos 126

Lista De Figuras

Figura 1. Ubicación Satelital de la Zona Afectada en la Vereda Campo Alegre (7°16'27.3"N 72°26'36.2"W)	61
Figura 2. Medición de la Temperatura In Situ	64
Figura 3. Derrame De Hidrocarburos En Suelos De Toledo, Norte De Santander	71
Figura 4. Caracterización macroscópica del crecimiento de colonias en agar petróleo	73
Figura 5. Caracterización Microscopia de Aislados Bacterianos en Suelos Contaminados Con Hidrocarburos.	75
Figura 6. Crecimiento de los Microorganismos en Cepas de Agar Sangre en la Prueba de Actividad Hemolítica	78
Figura 7. Crecimiento de los Microorganismos en Cepas de Agar Siegmund y Wagner	80
Figura 8. Producción de Espuma Durante la Incubación de los Medios de Cultivo	81
Figura 9. Actividad Lipolítica en Agar Rodamina.	81
Figura 10. Resultados Positivos al Emplear el Método de Dispersión de Aceite	82
Figura 11. Resultados Prueba de la Gota Colapsada	83
Figura 12. Prueba de Emulsificación de Aceite Mineral en Agua, Realizada por el Biosurfactante Producido por <i>Pseudomonas Fluorescens</i> 039t.	84
Figura 13. Prueba de Actividad Emulsificante y Fórmula Empleada	84
Figura 14. Índices de Emulsificación	101
Figura 15. Técnica de Cromatografía Gaseosa para Hidrocarburos Totales	102
Figura 16. Biodegradación de Hidrocarburos por Diferentes Cepas	102
Figura 17. Porcentajes de Degradación de Hidrocarburos.	103

Figura 18.Principales Filos Bacterianos según la Asignación Taxonómica	104
Figura 19.Identificación Molecular de una Cepa Productora de Biosurfactantes	105
Figura 20. Amplificación del Fragmento de ADN (777 Pb) y Árbol Filogenético de la Cepa P-1	106
Figura 21. Análisis Filogenético de <i>B. safensis</i> PHA3 Basados en las Secuencias de ARNr 16S	107
Figura 22. Identificación Molecular de Cepas Bacterianas Mediante el Gen 16S en Suelos Contaminados por Petróleo Crudo	108
Figura 23.Resultados Obtenidos Mediante el Análisis del ARNr 16S de las Cepas Aisladas de Sitios Crónicamente Contaminados con Hidrocarburos.	108
Figura 24. Aguas Contaminadas con Hidrocarburos en el Municipio Toledo, Norte de Santander	112
Figura 25. Comparación de la Media Anual de Materia Particulada en Diversos Países	120
Figura 26. Impacto Del Medio Ambiente En La Salud	121

Anexos

Anexo 1. Composición Medio Agar Petróleo	151
Anexo 2. Composición Medio Agar Cromogénico	151
Anexo 3. Composición Medio Agar Centrimide	152
Anexo 4. Composición Medio Agar Bushnell Haas	152
Anexo 5. Composición Medio Agar Medio Mínimo Salino (MSM)	153
Anexo 6. Composición Medio Agar Luria-Bertani (LB)	154
Anexo 7. Composición Medio de Cultivo R2A	154
Anexo 8. Composición Medio Plate Count Agar (PCA)	155
Anexo 9. Composición Medio Agar Siegmund Y Wagner	155
Anexo 10. Mapa: Redes de oleoducto en Colombia	156
Anexo 11. Mapa Oleoductos: Red Llanos Norte – Colombia	157

Resumen

El petróleo es la principal fuente energética del mundo, pero al ocurrir derrames, fugas o una inadecuada extracción y purificación por la industria petrolera se convierte en uno de los mayores contaminantes del planeta, provocando efectos negativos sobre el medio ambiente, representando un riesgo para la salud pública al expandirse en suelos y fuentes hídricas. No obstante, las bacterias hidrocarbonoclastas son capaces de tolerar y/o asimilar los hidrocarburos como fuente de carbono y energía al emplear mecanismos de adaptación como la producción de biosurfactantes que surgen como alternativa para biorremediar ecosistemas en los cuales el hombre con sus actividades diarias contribuye al deterioro de los recursos naturales. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo de investigación consistió en realizar un análisis bibliográfico del potencial biosurfactante de bacterias hidrocarbonoclastas en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos teniendo en cuenta la panorámica y los desafíos nacionales. Se evidencio que las bacterias hidrocarbonoclastas son una alternativa atractiva en procesos como la biorremediación de suelos, garantizando la conservación de la biodiversidad y aumentando la resiliencia natural de los suelos afectados por derrames de petróleo; donde los géneros bacterianos más representativos son *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. identificados mediante pruebas de actividad biosurfactante, caracterización molecular y secuenciación. Por último, se considera necesario desarrollar investigación basada en un alto rigor científico orientada en la biorremediación de sitios contaminados con petróleo a nivel regional y nacional.

Palabras claves. Contaminante, Hidrocarburos, Derrames, Microorganismos, Medio ambiente.

Introducción

El petróleo es la principal fuente energética del mundo, pero al ocurrir derrames, fugas o una inadecuada extracción y purificación por la industria petrolera se convierte en uno de los mayores contaminantes del planeta, provocando efectos negativos sobre el medio ambiente, representando un riesgo para la salud pública al expandirse en suelos y fuentes hídricas, afectando la productividad agrícola y la biota allí presente (Mendoza, 2018; Velásquez, 2016). En general, los hidrocarburos impiden el ingreso de nutrientes en el suelo y alteran los valores de pH, temperatura, humedad y, concentración de iones, impactando en el intercambio gaseoso con la atmósfera (Esquivel et al., 2018). Los microorganismos hidrocarbonoclastas (BHC) como bacterias, hongos y algas son capaces de transformar los hidrocarburos utilizándolos como fuente de carbono y energía, por ello, se consideran indispensables en ecosistemas contaminados con petróleo (Esquivel et al., 2018); algunos géneros bacterianos con esta capacidad son *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Leumthrix* (Bravo, 2018; Cevallos & García, 2018; Esquivel et al., 2018). No obstante, los estudios enfocados en el análisis bibliográfico de bacterias hidrocarbonoclastas y su potencial biosurfactante en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a nivel nacional y regional son escasos, por consiguiente, este trabajo tiene como finalidad el análisis y documentación de investigaciones enfocadas en bacterias hidrocarbonoclastas y su potencial biotecnológico en la producción de moléculas biosurfactantes en la presente era antropogénica teniendo en cuenta la panorámica y los desafíos nacionales.

1. Descripción del problema

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo General.

Analizar el potencial biosurfactante de bacterias hidrocarbonoclastas en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos teniendo en cuenta la panorámica y los desafíos nacionales.

1.1.2. Objetivos Específicos.

Documentar metodologías para la obtención de bacterias con potencial biosurfactante empleadas en procesos de biorremediación en suelos.

Estudiar las técnicas aplicadas en la evaluación de la actividad biosurfactante y los protocolos utilizados en la caracterización molecular y secuenciación de las bacterias hidrocarbonoclastas.

Argumentar los principales aportes y desafíos que enfrentan las bacterias hidrocarbonoclastas en los procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en la presente era antropogénica.

1.2. Planteamiento del Problema

En la actualidad, el petróleo es la principal fuente energética del mundo y puede ser empleado como materia prima en la elaboración de una amplia diversidad de productos. Sin embargo, al ocurrir derrames, fugas o una inadecuada extracción y purificación por la industria petrolera se convierte en uno de los mayores contaminantes del planeta, provocando efectos negativos sobre el medio ambiente, representando un riesgo para la salud pública al expandirse en suelos, fuentes hídricas y atmosfera, afectando el agua subterránea, las fuentes de agua potable, la productividad agrícola y la biota (Chiriví et al., 2020; Lugo, 2017; Mendoza, 2018; Velásquez, 2016). En los suelos, los hidrocarburos impiden el ingreso de nutrientes a las especies vegetales al modificar los valores de pH, temperatura, conductividad eléctrica, humedad y, concentración de iones Ca^+ , Mg^+ , K^+ , Na^+ , P , Al^{+++} , NO_3^- y N , afectando el intercambio gaseoso con la atmósfera (Esquivel et al., 2018).

Dicho lo anterior, entre los derivados del petróleo más peligrosos y altamente resistentes a la degradación se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), siendo altamente ecotóxicos; estos afectan gravemente la salud de los seres vivos al actuar como disruptores endocrinos, provocando estrés oxidativo en las células, además, presentan efectos carcinogénicos y mutagénicos (Lugo, 2017; Quijano et al., 2017). Así mismo, no tienden a evaporarse rápidamente, sino que, permanecen en la zona afectada por largos periodos de tiempo, provocando daños en los ecosistemas, siendo difícilmente degradados (Madigan, 2015; Ugaz et al., 2020).

Aun así, existen diversas alternativas para el tratamiento de los HAP en los suelos, una de las más efectivas es la biorremediación con lapsos de tiempo entre tres hasta veinticuatro meses

(Lugo, 2017; Mendoza, 2018), donde la comunidad microbiana nativa del suelo es la encargada de efectuar la biorremediación de una manera natural, restaurando los ecosistemas al emplear los hidrocarburos en fuentes de carbono y energía para su crecimiento (di Salvo & García de Salamone, 2018). La biorremediación es una técnica que utiliza organismos vivos como plantas y microorganismos con el fin de eliminar, neutralizar o disminuir algún tóxico o contaminante presente en el medio ambiente (Salcedo et al., 2019), transformándolo en sustancias inofensivas para la salud humana; resulta una alternativa frente a los métodos físico-químicos, reduciendo costos y alcanzando la eliminación total de compuestos xenobióticos u orgánicos presentes en los diferentes ecosistemas (García et al., 2019; Kulkarni & Kaliwal, 2015; Luján, 2019).

Además, esta técnica se caracteriza por la mineralización del contaminante, por su fácil aplicación y por no requerir maquinaria pesada, reduciendo la contaminación en los suelos. En los procesos metabólicos que los microorganismos llevan a cabo durante la biorremediación, se puede generar agua, CO₂ y biomasa celular, mediante enzimas microbianas que tienen la capacidad de oxidar los materiales contaminantes (Luján, 2019; Mayz & Manzi, 2017); las técnicas más utilizadas en biorremediación son la bioaugmentación y bioestimulación, las cuales pueden ser aplicadas de manera *in situ* o *ex situ* (García et al., 2019).

Por lo anterior, y teniendo en cuenta los impactos que se generan al presentarse derrames de hidrocarburos en los suelos, se quiere llevar a cabo con la presente investigación, el análisis bibliográfico del potencial biosurfactante de bacterias hidrocarbonoclastas en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos teniendo en cuenta la panorámica y los desafíos nacionales.

1.3. Formulación del Problema

¿Es posible realizar un análisis fundamentado sobre las bacterias hidrocarbonoclastas y su potencial biosurfactante en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en la presente era antropogénica teniendo en cuenta la panorámica y los desafíos nacionales?

1.4. Justificación

Los derrames de petróleo provocan efectos negativos sobre el medio ambiente, representando un riesgo para la salud pública al expandirse en suelos, fuentes hídricas y atmosfera (Chiriví et al., 2020; Lugo, 2017; Mendoza, 2018; Velásquez, 2016). Es por ello que, diferentes organizaciones como la Corporación autónoma regional de la Frontera Nororiental (CORPONOR) y Environmental Protection Agency (EPA), indican que es importante establecer planes de contingencia de tipo predictivo, preventivo y reactivo frente al manejo de zonas afectadas por hidrocarburos empleando técnicas biológicas enfocadas en procesos naturales, con el objetivo de disminuir los efectos negativos en la población y en el medio ambiente.

Así pues, la biorremediación se considera como una alternativa natural frente a los derrames de hidrocarburos que amenazan la vida en los ecosistemas al emplear el metabolismo microbiano para desintoxicar, transformar y eliminar los contaminantes, conservando la eficiencia en el proceso (Lugo, 2017; Torri et al., 2018). Resulta en una alternativa económica frente a los métodos convencionales de remediación, al emplear organismos vivos, metabolitos primarios o secundarios y enzimas libres, transformando el contaminante a CO₂ y agua mediante oxidación, disminuyendo los costos del proceso sin comprometer la estabilidad del medio

ambiente, al no requerir sustancias químicas (Pozzo, 2018). Por ende, para realizar una biorremediación efectiva sin comprometer el medio ambiente, es recomendable emplear microorganismos capaces de utilizar el contaminante como sustrato, por ello, los microorganismos hidrocarbonoclastas (BHC) son aplicados con frecuencia en zonas afectadas por la presencia de sustancias exógenas (Lugo, 2017), donde algunos microorganismos representativos son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus* sp., *Bacillus* sp., *Psychrobacter* sp., *Shewanella* sp., *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *B. megaterium* sp., *Pumilus* sp., *Psychrobacter immobilis*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas* sp., *Alcanivorax borkumensis* y *Cyclocaasticcus* sp. (Bravo, 2018; Ccance, 2018; Cevallos & García, 2018) Además, varios de estos poseen la capacidad de producir moléculas tensoactivas, debido a su maquinaria celular; estas moléculas reciben el nombre de biosurfactantes y presentan una amplia gama de aplicaciones especialmente para la mineralización y solubilización de hidrocarburos (Ali Khan et al., 2017; Vijayakumar & Saravanan, 2015).

Mediante el uso de la biorremediación se permitiría la recuperación de suelos afectados con hidrocarburos, beneficiando al sector petrolero, agrícola, hídrico, salud y ambiental. En la industria del petróleo se tendrían alternativas sostenibles que permitan reconstruir zonas afectadas por los derrames de crudo, activando un plan de contingencia y manejo ambiental; en el sector agrícola, el empleo de esta técnica permitirá el restablecimiento de suelos y cultivos afectados por derrames de hidrocarburos que resultan en el sustento económico de miles de familias campesinas. Por otro lado, en el sector hídrico, será una alternativa para disminuir las concentraciones del contaminante que impactan gravemente en los organismos acuáticos, arrecifes y agua subterránea; así mismo, en el sector salud y en el sector ambiente, se

minimizaría el riesgo de propagación de estas sustancias peligrosas en la cadena trófica hacia otros ecosistemas previniendo enfermedades en seres humanos y animales.

En definitiva, el país y sobre todo la región nortesantandereana presentan grandes problemáticas ambientales referente a los derrames de petróleo, de modo que en esta investigación se desea realizar un análisis bibliográfico del potencial biotecnológico en la producción de moléculas biosurfactantes por bacterias hidrocarbonoclastas en la presente era antropogénica teniendo en cuenta la panorámica y los desafíos nacionales.

2. Referentes Teóricos

2.1. Antecedentes de la Investigación

Los derrames de hidrocarburos generan impactos ambientales incalculables; la tragedia del buque petrolero Exxon Valdez en Alaska en 1989 ha sido considerada uno de los mayores casos de contaminación de petróleo en el mundo al derramar 11 millones de galones al mar, así mismo, en el golfo de México en 2010 se vertieron más de 13 millones de galones en el océano Atlántico. Sin embargo, Colombia ha superado estos incidentes en gran proporción (Velásquez, 2016; Guerrero, 2018). En Norte de Santander, la producción de petróleo en la zona de Catatumbo es considerada como una de las pioneras en el país (Vargas & García, 2018), viéndose gravemente afectada por la continua explotación de sus recursos naturales (Collazos & López, 2018).

Así mismo, en el municipio de Mutiscua, Norte de Santander, Colombia, los autores Quijano, Navia, & Portilla, (2014), identificaron en muestras hídricas la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos, en su mayoría benzofluorantenos y benzopireno, en tejidos de Truchas arco iris. Por otro lado, Meléndez, Quijano, & Quijano (2016), identificaron 18 tipos de PAH en el aire de Villa del Rosario, Norte de Santander, provenientes del tráfico vehicular.

A pesar de los diferentes daños ocasionados por los derrames de hidrocarburos que afectan al medio ambiente y a sus habitantes en Norte de Santander, no se han encontrado investigaciones realizadas en el campo de la biorremediación enfocadas en la obtención de microorganismos con capacidad biosurfactante. No obstante, en Colombia, la biorremediación ha

sido implementada hace aproximadamente veinte años, en donde las especies microbianas más representativas son *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Bacillus*, y *Chrysobacterium*, encontradas en los Llanos Orientales, la Orinoquia y la costa Atlántica llegando a tolerar hidrocarburos y degradando tolueno, xileno, fenol, naftaleno, diésel, gasolina, entre otros (Mesa, Milena, Ortega, & Sandova, 2018). En un estudio realizado en el Caribe Colombiano, se logró identificar cepas de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. presentes en ecosistemas contaminados con petróleo crudo en concentraciones del 1 al 8%, degradando cerca del 92% del hidrocarburo (Hernández, 2018), así mismo, los autores Ordoñez, Abella, Echeverry, Paz & Benítez, (2019), aislaron microorganismos nativos tales como, *C. metapsilosis* SH1 y *B. cepacia* SH3 capaces de tolerar concentraciones de queroseno del 2% al 10%, al emplear el hidrocarburo como única fuente de carbono. Igualmente, el Instituto Colombiano del Petróleo (ICP), llevo a cabo la producción de un biosurfactante de tipo ramnolípido utilizando la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ICP 70, observando una eficiencia del 76% incrementando la biodegradación de hidrocarburo siendo una alternativa a los aditivos químicos convencionales (Rosero, Dugarte, Lorely, Piedad & Carvajal, 2002).

Por otro lado, en Argentina se realizó la producción de un biosurfactante a partir de microorganismos criopreservados, previamente aislados a partir de sitios crónicamente contaminados con hidrocarburos, donde *Pseudomonas koreensis* redujo la tensión superficial del hidrocarburo alcanzando valores de 46,3% y 54,7% (Liporace, 2018). Mientras que, en Ecuador se llevó a cabo un estudio para aislar e identificar microorganismos con capacidad de biodegradar petróleo, en el que se destacaron las cepas *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia rubidaea*, *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Brevibacterium* sp., *Spirillum* sp., *Xanthomonas* sp., *Alcaligenes* sp. (Abasolo & Morante, 2019).

Después de todo, las investigaciones realizadas en los diferentes sectores socioeconómicos permiten evidenciar los diversos daños ocasionados por los hidrocarburos a nivel regional, nacional e internacional haciendo necesario el uso de técnicas sostenibles que aporten a la restauración de los distintos ecosistemas afectados, como lo hace la biorremediación.

2.2. Marco Teórico

2.2.1. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos

2.2.1.1. Hidrocarburos, principales contaminantes. Los Hidrocarburos (HC) son compuestos químicos que poseen átomos de carbono dispuestos en una cadena lineal, ramificada o formando anillos. Cuando la molécula formada posee anillos se denomina hidrocarburo cíclico; un ciclo no saturado recibe el nombre de hidrocarburos aromáticos y son muy comunes en sitios donde han ocurrido derrames de petróleo (Romaniuk, Giuffré, & Costantini, 2018). Por otro lado, si la molécula se presenta de forma lineal recibe el nombre de hidrocarburo alifático y, se suelen encontrar en los espacios porosos del suelo (Velásquez, 2016). Entre sus principales derivados se encuentra el petróleo, conformado por hidrocarburos de distinto peso molecular, encontrado en reservorios naturales donde se encuentra sometido a alta presión y temperatura; su nombre petroleum deriva del latín petra (roca) y óleum (aceite). Se puede encontrar de 3 formas: gas natural (no condensado a T° ambiente), gas (condensado a T° ambiente) y crudo (forma líquida). La relación generalizada de H/C es 1,85 y su composición es azufre 0,1–7,9 %, nitrógeno 0,02–1,61 %, oxígeno 0,08–1,80 %, trazas de fósforo y metales pesados (V, Ni, Fe, Mn, Pb), agua de formación e inyección de alta salinidad. Además, posee alcanos o parafinas,

cicloalcanos o cicloparafinas, alquenos u olefinas y arenos o aromáticos (<15 %) (Esquivel-Cote, Ferrera-Cerrato, & Alarcón, 2018; Mendoza, 2018).

Según Pozzo 2018, el petróleo se clasifica en **petróleo Ligero**, un ejemplo común es la gasolina; **petróleo de fracción media**, ejemplos de este tipo son el combustible diésel y el kerosene y, **petróleo de fracciones más pesadas**, como los aceites lubricantes.

Así mismo, **los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH)**, forman parte de los hidrocarburos aromáticos en concentraciones desde 1 µg/kg y hasta 10 mg/kg; son complejos compuestos orgánicos que contienen dos o más anillos aromáticos predispuestos de manera lineal, angular o circular formando compuestos heterocíclicos. Además, contienen átomos de N, O, S y metales pesados como el Vanadio y el Níquel en menor proporción (Mendoza, 2018). Se clasifican en HAP de **bajo peso molecular** (HMW-HAP) como el naftaleno, fluoreno, fenantreno y antraceno que poseen alta volatilidad, baja afinidad con las partículas del agua y, menor toxicidad, en comparación a los HAP de **alto peso molecular** (HMW-HAP) que se componen de 4-7 anillos y se caracterizan por ser recalcitrantes, insolubles en el agua, tener alta adsorción por partículas del aire y del agua y, ser tóxicos para los humanos, estos van desde el criseno al coronenes (Lugo, 2017; Amaringoa, Narváezb, Gómez-Arguelloa, & Molina, 2019).

2.2.1.2. Impactos en el suelo por derrames de hidrocarburos. El suelo es un recurso natural encargado de sostener la vida en el planeta mediante condiciones climáticas y topografías determinadas, las cuales dependen de las actividades que realizan los organismos vivos (Peña, Zambrano, Baquerizo, Antón & Solórzano, 2019); es un sistema dinámico que se encuentra conformado por materia orgánica, agua, nutrientes y oxígeno, encargados del desarrollo de la vida. Así mismo, sus capas se diferencian, entre sí, por su textura, estructura, color, composición

química, mineralógica y biológica (Cevallos & García, 2018). Cuando el suelo se encuentra en condiciones óptimas tiene capacidad de amortiguamiento al permitir el desarrollo correcto de los ciclos biogeoquímicos, conservando sus propiedades químicas, físicas y biológicas (Peña et al., 2019).

Sin embargo, el suelo está siendo afectado por la presencia de contaminantes que presentan una tasa de biodegradación natural más lenta (Di Salvo & García de Salamone, 2018). Cabe resaltar que, la acumulación de los contaminantes en el suelo provoca la degradación química del mismo, es decir, se presenta una disminución en la fertilidad del lugar afectado (Torri et al., 2018; Di Salvo & García de Salamone, 2018; Peña et al., 2019). Por esta razón, un suelo contaminado con petróleo disminuye su fertilidad al perder nutrientes indispensables como el nitrógeno, fósforo, oxígeno y potasio, acidificándolo (pH de 4 a 5) y, causándole la muerte a los microorganismos autóctonos presentes (Cevallos & García, 2018); provocando pérdidas en la biodiversidad, cambios en el sustrato original y, enfermedades en la población humana cercana al lugar afectado (Pérez, 2018). Además, cuando los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) se encuentran en diversos cultivos son absorbidos por las raíces de las plantas inhibiendo el crecimiento de las mismas; en el sistema vascular se diseminan, por lo cual logran llegar a la zona más alta de la especie vegetal, causando la expansión del contaminante en la atmósfera y, provocando cambios en la cadena trófica (Torri et al., 2018).

2.2.1.3. Alternativas en la recuperación de suelos. Una alternativa a la toxicidad, movilidad o volumen de compuestos contaminantes son las tecnologías de remediación que implican operaciones unitarias empleando métodos químicos, físicos o biológicos teniendo en cuenta factores como el tiempo, propiedades fisicoquímicas, costos y disponibilidad de los

contaminantes. Existen tres tipos de tratamientos que implementan la tecnología de remediación:

- 1) Tratamientos biológicos: involucran a microorganismos y plantas con capacidad metabólica para transformar o remover contaminantes del medio ambiente utilizándolos como sustratos celulares, la técnica más utilizada es la Biorremediación;
- 2) Tratamientos fisicoquímicos: se caracteriza por tener bajo costo, realizarse de forma in situ o ex situ y finalizar en cortos periodos de tiempo implementando las propiedades físicas o químicas de los contaminantes o del medio en el que se encuentran ; con la finalidad de efectuar su degradación, destrucción, separación e inmovilización;
- 3) Tratamientos térmicos: para lograr la separación, quema, descomposición, volatilización , fundición o inmovilización del compuesto exógeno se emplean altas temperaturas. Sin embargo, estos tratamientos se implementan para pequeños lapsos de tiempo y económicamente no son favorables (Lugo, 2017).

Por ende, en la rehabilitación de suelos contaminados por hidrocarburos se suele emplear la biorremediación, encargada de utilizar microorganismos nativos que generan la degradación del contaminante y, por ende, la restauración del suelo (Pozzo, 2018). Existen diversos factores a tener en cuenta para que una biorremediación sea efectiva como la **disponibilidad de nutrientes**, los microorganismos encargados de metabolizar los contaminantes requieren para su asimilación nutrientes como fósforo, nitrógeno y carbono en una relación C:N:P (100:10:1); **pH**, cuando no se encuentra en un intervalo de 6 a 8 afecta la solubilidad del fósforo y no permite el movimiento de los metales pesados; **temperatura**, en situaciones donde la temperatura supere los 40°C o permanezca por debajo de los 0°C se puede presentar la desnaturalización e inhibición de las enzimas encargadas de la biodegradación de contaminantes; **humedad**, los microorganismos requieren agua para permitir el transporte de compuestos orgánicos y nutrientes hacia el interior de sus células, sin embargo, un aumento excesivo de la humedad

causa la disminución de la concentración de oxígeno en el suelo; **estructura química del hidrocarburo**, su biodegradabilidad se ve afectada cuando la molécula presenta ramificaciones, compuestos halogenados y baja solubilidad del agua y, por último la **conductividad eléctrica**, es empleada para determinar la concentración de sales en el suelo, puede variar entre 0.17 a 0.5 dS/m (Cevallos & García, 2018).

2.2.1.4. Técnicas de biorremediación. Al implementar técnicas de remediación, la tecnología biológica que más ha llamado la atención es la biorremediación, en donde los microorganismos poseen la capacidad de reducir sustancias tóxicas de forma natural a sustancias inofensivas (agua, dióxido de carbono y biomasa celular) en el ambiente, observar Tabla 1. Para asegurar la degradación total o parcial de los contaminantes se deben tener en cuenta factores como la concentración de nutrientes, oxígeno disuelto en el medio, un pH adecuado, las características físico-químicas del lugar afectado, cantidad y tipo de sustancia exógena (Lugo, 2017; Mayz & Manzi, 2017).

Tabla 1. Principales ventajas y desventajas de la Biorremediación.

Ventajas	Desventajas
Transfiere poca contaminación de un medio (gaseoso, líquido y sólido) a otro.	Se pueden generar compuestos metabólicos no deseados al realizarse una degradación incompleta.
No requiere componentes mecánicos o estructurales que pueden afectar el medio.	La biorremediación de puede inhibir por sustancias químicas resistentes.
Involucra procesos naturales y es de bajo costo.	La duración, control de velocidad y extensión del proceso es impredecible.

Fuente propia.

La **biorremediación “in situ”** resulta la opción más adecuada para la recuperación de suelos, ya que, no implica la preparación y excavación del material contaminado, debido a que se aplica en la misma zona contaminada, reduciendo significativamente los costos (Pinto & Sánchez, 2018; Chiriví et al., 2019; Ruiz, 2019). A su vez, estimula y crea un ambiente favorable para los microorganismos; su uso es recomendable en suelos permeables. Sin embargo, deben tenerse en cuenta factores como el impacto ambiental en la zona, la dificultad de acceso a la zona contaminada para la obtención de oxígeno y nutrientes, la velocidad del proceso y el peligro potencial de la extensión del contaminante; siendo menos efectiva que las técnicas de biorremediación “ex situ” (Torres & Zuluaga, 2009; Lugo, 2017; Ruiz, 2019). Dependiendo la volatilidad del compuesto, la biorremediación in situ se divide en: tratamiento de compuestos volátiles y tratamiento de compuestos semivolátiles y no volátiles, donde, las técnicas más utilizadas son bioaireación, bioaumentación, inyección de aire a presión y bioestimulación (Torres & Zuluaga, 2009). Cabe resaltar que una de las técnicas más empleadas en la industria de los hidrocarburos es la bioaumentación de microorganismos (Ruiz, 2019).

Por consiguiente, la biotransformación consiste en la capacidad que poseen algunos microorganismos para tolerar y permanecer en ecosistemas con alta concentración de contaminantes, mediante el empleo de enzimas específicas (Bedoya, Castaño, & Susana, 2019); la bioaumentación permite el ingreso de microorganismos que posean la capacidad de biodegradar los contaminantes presentes en la zona afectada (Reyes et al., 2018), es comúnmente utilizada al efectuar tratamientos inmediatos o cuando los microorganismos son insuficientes en número y capacidad degradadora, como se puede apreciar en la Tabla 2. Esta técnica se suele emplear para descontaminar suelos con herbicidas, insecticidas, nitrofenoles, BPC, HTP y HAP (Lugo, 2017).

Tabla 2. Principales ventajas y aspectos a tener en cuenta en la bioaumentación.

Aspectos a tener en cuenta	Ventajas
Condiciones ambientales	Capacidad de los microorganismos para sobrevivir a los depredadores.
Movilidad y/o distribución de microorganismos	Selección de los consorcios microbianos y del ambiente más adecuado.
Elevada presencia de materia orgánica	Controlar la presencia de toxinas y nutrientes.
	Se aplica directamente en la zona afectada
	No requiere maquinaria pesada
	Los microorganismos crecen rápidamente en el medio contaminado

Fuente propia

Así mismo, la bioaireación hace referencia a la adición de aire, mediante un sistema de extracción e inyección, al lugar contaminado favoreciendo la actividad biodegradativa de los microorganismos presentes en áreas poco profundas y pequeñas (Benavides & Castillo, 2017), es comúnmente utilizada para tratar contaminantes que poseen baja volatilidad teniendo en cuenta las características de la zona contaminada, observar Tabla 3 (Torres & Zuluaga, 2009; Chiriví et al., 2019).

Tabla 3. Principales ventajas y desventajas en la bioaireación.

Ventajas	Desventajas
Trata contaminantes con baja presión de vapor (menos de 1 mmHg).	Causa pérdida de nutrientes y baja humedad en el suelo.
Posee una alta tasa de biodegradación en comparación con la volatilización.	Tiene una longevidad elevada, en donde los tiempos de limpieza pueden durar de meses a años
Es una alternativa económica frente a otros tratamientos “in situ”.	Es limitada por el tipo y concentración del contaminante.

No requiere el uso de maquinaria pesada.	Es un proceso que puede darse más por la volatilización que por la biodegradación.
--	--

Fuente propia

A su vez, la inyección de aire a presión es una técnica utilizada para desplazar el agua presente en los espacios intersticiales del suelo, al inyectar aire a presión que absorbe gran cantidad de los hidrocarburos volátiles y eleva los niveles de oxígeno, favoreciendo la degradación en el suelo o agua (Torres & Zuluaga, 2009). Lo anterior se puede apreciar en la Tabla 4.

Tabla 4. Principales ventajas, desventajas y aspectos a tener en cuenta en la Técnica de Inyección de aire a presión.

Aspectos a tener en cuenta	
Los compuestos con cadenas lineales de hasta 20 carbonos son más fáciles de biodegradar en comparación a los compuestos aromáticos.	
Se recomienda aplicarse en suelos homogéneos con bajo contenido de arcilla y buen contenido de oxígeno.	
Requiere pH (6 a 8), humedad (12 a 30% en peso), temperatura entre 0 y 40 °C y nutrientes en relación N:P de 10:1.	
Los compuestos de alta volatilidad (presión de vapor mayor de 10 mm de Hg a 20°C) tienen mayor efectividad.	
Ventajas	Desventajas
Es efectivo en zonas afectadas por la contaminación de compuestos volátiles.	Depende de la biodisponibilidad de los microorganismos.
Requiere cortos periodos de tiempo.	El agua subterránea puede verse afectada por el movimiento de los contaminantes.
Se emplea directamente en la zona afectada.	Requiere profundidades de 1,2 metros, pero no superiores a 9 metros.
No emplea maquinaria pesada.	Cualquier cambio en la litología del suelo puede afectar el proceso.

Fuente propia

Por otro lado, la bioestimulación emplea un sistema de pozos de extracción para estimular la degradación de los contaminantes utilizando un reactor en la superficie del suelo o acuífero, que contiene nutrientes, oxígeno, agua y microorganismos adaptados para la degradación (Torres & Zuluaga, 2009; Reyes et al., 2018). Lo anterior se puede apreciar en la Tabla 5.

Tabla 5. Principales ventajas y aspectos a tener en cuenta en la bioestimulación.

Aspectos a tener en cuenta	Ventajas
Se recomienda el empleo de suelos homogéneos, con porosidad y aire adecuado.	Es muy utilizada en zonas extensas donde no se puede suspender el proceso
Condiciones óptimas de pH (6-8), humedad (12-30% en peso), temperatura entre 0 y 40 °C.	operativo.
Los nutrientes del suelo deben tener una relación N:P de 10:1.	

Fuente propia

En cambio, la **biorremediación “ex situ”** se aplica en un lugar diferente a la zona afectada cuando la contaminación es muy profunda, retirando el material a tratar, trayendo como consecuencia problemas de salud a los excavadores (Ramírez & Martínez, 2018; Chiriví et al., 2019; Ruiz, 2019). Se caracteriza por tener un mejor control del proceso, monitoreando la zona con mayor facilidad y optimizando los parámetros microbiológicos; sin embargo, requiere mayores costos debido al transporte de la muestra de suelo contaminado al laboratorio de investigación, situación que requiere un mayor tiempo de tratamiento (Torres & Zuluaga, 2009; Ramírez & Martínez, 2018; Pinto & Sánchez, 2018; Ruiz, 2019). **El tratamiento vía suspensión** se realiza en condiciones de saturación de agua al excavar el material contaminado y trasladarlo

a un reactor (Torres & Zuluaga, 2009); **la biorrecuperación vía sólida** se puede realizar por dos métodos: tratamiento en fase de lodos (mezclar el suelo con microorganismos, nutrientes y agua, para tratar capas de suelo superficiales) y tratamiento por compostaje (los suelos se disponen en unas membranas o celdas donde se les agrega agua y nutrientes, para formar grandes biopilas) (Torres & Zuluaga, 2009; Lugo, 2017).

Así pues, el compostaje es una técnica que involucra paja, aserrín, estiércol o desechos agrícolas sobre el suelo contaminado para favorecer el balance de nutrientes, incrementar la aireación, acelerar la degradación y generar calor en el mismo. Es utilizada para la biorremediación de con PCP, gasolinas, HTP y HAP (Torres & Zuluaga, 2009; Chiriví et al., 2019). Mientras que, el landfarming consiste en la remoción y extensión de los suelos contaminados para favorecer la degradación de hidrocarburos por parte de los microorganismos, se le suele llamar tratamiento en lechos o tratamiento vía sólida. Es necesario airear el suelo de manera regular para proporcionarle oxígeno y se recomienda diseñar sistemas para evitar la entrada de agua a la zona, observar la tabla 6. Las bacterias capaces de utilizar la lactosa, son las más utilizadas para realizar esta labor, como *Pseudomonas* sp. (Torres & Zuluaga, 2009; Chiriví et al., 2019).

Tabla 6. Principales ventajas, desventajas y aspectos a tener en cuenta en la técnica Landfarming.

Aspectos a tener en cuenta	
Condiciones geológicas y geoquímicas favorables	
Trabajar con un solo tipo de consorcio microbiano	
Conocer las condiciones ambientales adecuadas	
Emplear microorganismos autóctonos	
Ventajas	Desventajas
Posee niveles económicos favorables	Requiere una gran área de trabajo.

Permite una fácil manipulación y control de las variables de diseño.	No existe control de la volatilización de los contaminantes.
No requiere un estudio avanzado para su elaboración	Si la contaminación es profunda, los costos son altos.

Fuente propia

Así mismo, la técnica de bioceldas o biopilas se realiza en un sistema cerrado y se caracteriza por la disminución de la concentración de hidrocarburos en suelos excavados bajo condiciones no saturadas formando pilas biodegradables a las cuales se les adiciona nutrientes y oxígeno de forma activa, volteando la pila, o bien de forma pasiva, mediante tubos perforados de aireación (Torres & Zuluaga, 2009; Chiriví et al., 2019). Lo anterior se puede apreciar en la Tabla 7.

Tabla 7. Principales ventajas, desventajas y aspectos a tener en cuenta en la técnica bioceldas.

Aspectos a tener en cuenta	
Hidrocarburos no halogenados en concentraciones menores a 50.000 ppm	
Requiere grandes áreas de trabajo	
Se necesita que la densidad de poblaciones microbianas sea >1.000 CFU/gramo de suelo, humedad de 40 a 85% de capacidad de campo, temperatura de 10 a 45°C, pH de 6-8 y baja presencia de metales (< 2.500 ppm).	
Suelos con baja proporción de arcillas y una relación C: N:P de 100:10:1	
Ventajas	Desventajas
Eficiente con bajas concentraciones de hidrocarburos.	Pueden generarse gases o vapores de hidrocarburos volátiles de alto peso molecular.
Al ser un sistema cerrado, existe un mayor control de las variables del proceso.	Si la contaminación es profunda, los costos son altos.

Permite la construcción de pilas cuatro o cinco veces más altas que en una disposición sobre el suelo.

Fuente propia

Finalmente, el tratamiento de biosuspensión se lleva a cabo dentro de un biorreactor al cual se le adicionan nutrientes, agua y cultivos microbianos aptos para que suceda la biodegradación. La velocidad de degradación y crecimiento microbiano regulan la transferencia de oxígeno mediada por aireación difusa, turbina difusora y aireación superficial; así mismo, la aireación ayuda a romper los flóculos de tierra y a disolver los contaminantes (Torres & Zuluaga, 2009; Chiriví et al., 2019). Observar la Tabla 8.

Tabla 8. Principales ventajas y desventajas en el tratamiento de biosuspensión.

Ventajas	Desventajas
Existe elevado contacto entre contaminantes, microorganismos y distintos factores.	Los contaminantes volátiles tienden a escaparse en forma de emisiones gaseosas.
Mayor control en las variables de operación del biorreactor, siendo una tecnología efectiva.	Es altamente costosa.
Se puede efectuar en suelos con residuos oleosos y de consistencia alquitranada.	

Fuente propia

2.2.2. Bacterias Hidrocarbonoclastas y su Potencial en la Producción de Biosurfactantes

2.2.2.1. Microorganismos Hidrocarbonoclastas (BHC). Los microorganismos (bacterias, hongos y algas) capaces de transformar parcial o totalmente los hidrocarburos para utilizarlos como fuente de carbono y energía reciben el nombre de microorganismos

hidrocarbonoclastas (BHC); por ende, se consideran indispensables en ecosistemas contaminados con petróleo, ya que, pueden degradar hidrocarburos policíclicos aromático, los cuales son altamente tóxicos (Esquivel-Cote et al., 2018). Son considerados microorganismos cosmopolitas, al encontrarse en aire, suelo y agua (Bravo, 2018); se caracterizan por su capacidad de utilizar un amplio rango de hidrocarburos como fuente carbono y energía, producir biosurfactantes, reducir la tensión superficial, poseer alta hidrofobicidad y habilidad para expresar genes catalíticos a través de vías aeróbicas y anaeróbicas. (Esquivel-Cote et al., 2018; Cevallos & García, 2018).

Inclusive, algunos poseen enzimas oxigenasas e hidroxilasas, encargadas de romper los enlaces C-C en las posiciones orto y meta de hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Además, los genes *alk* (*alkB1* y *alkB2*) son los encargados de regular la oxidación y la hidroxilación de hidrocarburos; el primero regula la degradación de un n-alcano de cadena corta al codificar un alcano hidroxilasa. Algunos géneros microbianos con esta capacidad pueden ser *Aeromonas*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium*, *Sphingomonas*, *Nocardia*, *Micrococcus*, *Burkholderia*, *Oceanospirillales*, *Pseudomonas*, *Alkanivorax*, *Cycloclasticus*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beneckea*, *Brevebacterium*, *Coryneformes*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Leumthrix*, *Moraxella*, *Peptococcus*, *Sarcina*, *Spherotilus*, *Spirillum*, *Streptomyces* y, *Xanthomyces* (Esquivel-Cote et al., 2018; Bravo, 2018; Cevallos & García, 2018).

Así mismo, las principales enzimas expresadas durante el proceso de hidroxilación de hidrocarburos aromáticos son las dioxigenasas (ferroproteínas del grupo no hemo), las cuales actúan en presencia de oxígeno y NADH. Por otro lado, para la degradación de los anillos aromáticos se emplea la enzima benceno deshidrogenasa que depende del NAD⁺. (Hernández, 2018).

2.2.2.2. Degradación de Hidrocarburos por Bacterias Hidrocarbonoclastas. Debido a que el petróleo es insoluble en agua, flota en la superficie y forma capas finas, los microorganismos se adhieren a las gotículas de petróleo y crecen con rapidez sobre las películas para oxidarlo hasta CO₂. *Alcanivorax borkumensis* es una bacteria especializada que crece únicamente en hidrocarburos, ácidos grasos o piruvato, produce tensoactivos para degradar el petróleo y poderlo solubilizar para que pueda ser incorporado más fácilmente y utilizarlo como donador de electrones y fuente de carbono. (Madigan et al., 2015). Este contaminante puede ser degradado tanto en condiciones aerobias como anaerobias, siendo la primera la más utilizada (Pérez, 2018). En condiciones aerobias, las dioxigenasas adicionan al anillo de benceno un átomo de oxígeno, esto produce cisdihidrodiol y la apertura del anillo aromático; luego, la enzima deshidrogenasa es la encargada de actuar sobre el compuesto para dar como resultado la formación de un intermedio dihidroxilado (Shukla et al., 2014; Pérez, 2018). Mientras que, en condiciones anaerobias, los iones nitrato, ferrosos y sulfato son los aceptores de electrones; así mismo, se suele adicionar fumarato para la degradación de HAP mediante una enzima de radical glicilo logrando la metilación de los aromáticos no sustituidos, la enzima deshidrogenasa provoca la hidroxilación de un alquilo, dando como resultado la carboxilación (Madigan et al., 2015; Chiriví et al., 2019).

Paralelamente, las enzimas encargadas de catalizar la incorporación de oxígenos en compuestos orgánicos reciben el nombre de oxigenasas y, se clasifican en dioxigenasas y monooxigenasas. Las primeras incorporan dos átomos de oxígeno a la molécula del compuesto orgánico; las segundas incorporan solo un átomo de oxígeno a la molécula, mientras que reducen

el otro átomo a agua. Para la mayoría de las monooxigenasas, el donador de electrones necesario es NADH o NADPH (Madigan et al., 2015; Hernández, 2018).

2.2.2.3. Rutas Metabólicas responsables de la Degradación. La ruta *alk*, es utilizada para degradar aeróbicamente n-alcanos mediante la enzima alcano hidroxilasa, la cual oxida un grupo metilo generando n-alcanoles; así mismo, la ruta *nah* presenta dos opciones para la degradación del naftaleno, en una de ellas se obtiene como producto final ácido nafatóico, mediante la hidroxilación del grupo metilo, mientras que la otra se encarga de oxidar los anillos aromáticos para dar como resultado metil salicilato y metil catecol y, la ruta *xly*, es la encargada de la degradación del tolueno y del xileno mediante el plásmido TOL, el producto final varía dependiendo de la especie bacteriana (Pérez, 2018).

2.2.2.4. Principales Bacterias Hidrocarbonoclastas. Según Shukla et al., 2014, los principales grupos bacterianos degrandantes son *Pseudomonas putida*; *Pseudomonas fluorescens*; *Pseudomonas paucimobilis*; *Pseudomonas mendocina*; *Pseudomonas vesicularis*; *Pseudomonas cepacia*; *Alcaligenes sp.*; *Mycteronas spificans*; *Alcaligenes faecalis*; *Bacillus cereus*; *Vibrio sp.*; *Cyclotrophicus sp.*; *Stenotrophomonas maltophilia*; *Beijerinckia sp.*; *Micrococcus sp.*; *Nocardia sp.* y, *Flavobacterium sp.*

2.2.2.5. Producción de Biosurfactantes. Un surfactante es una molécula anfifílica capaz de favorecer la degradación de hidrocarburos y derivados permitiendo la desorción de ellos en agua y suelo, aumentando su movilización en el medio (Vaca, 2016); son resistentes a la biodegradación y, por ende, son tóxicos. No obstante, cuando los microorganismos lo producen

intra o extracelularmente reciben el nombre de biosurfactantes o bioemulsionantes (Ugaz et al., 2020). Los biosurfactantes producidos por bacterias, levaduras y hongos, son moléculas anfifílicas con una región hidrofóbica y una región hidrofílica, encargadas de reducir la tensión superficial aumentando la solubilidad del contaminante. Además, funcionan como emulsificantes aumentando la solubilidad de los hidrocarburos, lo cual les facilita a las células microbianas su degradación (Rodríguez, Zúñiga & Barboza, 2012; Becerra & Horna, 2016; Benavides & Castillo, 2017). Cabe resaltar que, los factores ambientales y nutricionales son condiciones que ayudan a la producción de biosurfactantes (Giraldo, Gutiérrez, & Merino, 2014).

De igual forma, los biosurfactantes se pueden producir a partir de materias primas renovables y, en zonas contaminadas con hidrocarburos derivados del petróleo juegan un papel importante al reducir la tensión superficial entre el agua y el aceite; sin embargo, producirlos resulta económicamente costoso, ya que se requieren microorganismos especializados (Benavides & Castillo, 2017). Es por ello, que se recomienda utilizar los microorganismos nativos del área contaminada.

2.2.2.6. Tipos, Propiedades y Principales Bacterias Productoras de Biosurfactantes.

Según Becerra & Horna, (2016) “Los biosurfactantes producidos por bacterias, hongos, y levaduras incluyen glicolípidos, lipoaminoácidos, lipopéptidos, lipoproteínas, lipopolisacáridos, fosfolípidos, monoglicéridos y diglicéridos. Actualmente se sabe que el tipo de biosurfactante producido depende del tipo de microorganismo que lo produce.” El género *Pseudomonas* sp. produce biosurfactantes glicolípidicos, también llamados trehalolípidos, soforolípidos y ramnolípidos (Becerra & Horna, 2016; Giraldo *et al.*, 2014) al crecer en presencia de hidrocarburos, estimulando la producción de estas moléculas y facilitando su ingreso por la pared

celular (Pérez, Coto, Echemendía, & Ávila, 2015); durante la fase estacionaria permitiendo solubilizar compuestos hidrofóbicos (Morante et al., 2019). Se sabe que, especies del género *Pseudomonas* sp. producen biosurfactantes ramnolípidos (Giraldo et al., 2014).

De modo que, **los ramnolípidos** son biosurfactantes (Vilasó, Rodríguez, & Ábalos, 2016), encargados de biodegradar hidrocarburos alifáticos y aromáticos (Luján, 2019); estos se conforman por un glucósido de β - hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato y dos moléculas de ramnosa (Vijayakumar & Saravanan, 2015). Disminuyen la tensión superficial del agua de 72 mN/m a 30 mN/m y la tensión interfacial del agua/aceite de 43 mN/m a 1 mN/m. Los factores nutricionales y ambientales como pH, nitrógeno y temperatura controlan la biosíntesis y producción de estos en las fases exponencial tardía y estacionaria de crecimiento (Toribio et al., 2014). Por otro lado, **los trehalolípidos** reducen la tensión superficial e interfacial de 25-40 y 1-5 mNm, son principalmente producidos por especies como *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Corynebacterium*; **los soforolípidos** son una mezcla de seis a nueve soforolípidos hidrófobos diferentes conformados por una soforosa de carbohidrato dimérica unida a un ácido graso hidroxilo de cadena larga por enlace glicosídico, generalmente son producidos por levaduras; los biosurfactantes **lipopéptidos y lipoproteínas** presentan actividad antimicrobiana y constan de un lípido unido a una cadena polipeptídica; *Bacillus subtilis* produce el biosurfactante iturina con actividad antibacteriana (Vijayakumar & Saravanan, 2015).

Así mismo, **la surfactina** es un lipopéptido cíclico conformado por una estructura de anillo de siete aminoácidos unidos a una cadena de ácido graso por un enlace lactona; **la artrofactina** es un lipopéptido cíclico que contiene once aminoácidos unidos a un ácido graso β -hidroxidecanoil. Se encuentra dentro del grupo de la amfisina y su estructura química es similar a la lokisina; **la viscosina** reduce la tensión superficial del agua de 72 a 27 mN/m y está

conformada por ácido hidroxidecanoico, su estructura es similar a la tolasina, surfactina, siringomicina y siringopéptina; la *viscosamida* es un metabolito primario perteneciente a los depsipéptidos cíclicos y su estructura es similar a la viscosina. Posee aminoácidos D-glutamico y Dglutamina; la *lichenisina* es un biosurfactante estable en condiciones extremas similar a la surfactina, reduce la tensión superficial y la tensión interfacial del agua a 27 y 0,36 mN m⁻¹; la *siringomicina* es un lipodepsinonapéptido que tiene la secuencia Ser-D-Ser1-D-Dab-Dab-Arg-Phe-Dhb-(3-OH) Asp-(4 -Cl)Thr, unida a una cola de ácido 3-hidroxidecanoico y 3-hidroxitetradecanoico; la *tolasina* es una toxina lipopéptidica cíclica que produce disrupción de la membrana y tiene actividad biotensoactiva, consiste en 18 aminoácido; la *putisolvina* es generada en ambientes contaminados con metales pesados y PAHs; la *entolisina* contiene catorce aminoácidos unidos al ácido 3-hidroxidecanoico (Toribio et al., 2014; Vijayakumar & Saravanan, 2015).

De igual forma, los **ácidos grasos, fosfolípidos y lípidos neutros** son biosurfactantes con aplicaciones médicas producidos por varias especies de bacterias y levaduras. Además, los **biosurfactantes poliméricos** son ampliamente estudiados, entre ellos se encuentran: **emulsan**, agente emisor eficaz de hidrocarburos en el agua; **liposan**, emulsionante extracelular soluble en agua compuesto por carbohidratos y proteínas (83% y 17%), utilizado en las industrias alimentarias y cosméticas; **alasan; lipomanan** y, **complejos de polisacárido-proteína**. Por último, los **biosurfactantes particulados** están conformados de proteína, fosfolípidos y lipopolisacárido, desempeña un papel importante en la captación de alcanos por las células microbianas y son encontrados en las vesículas de la membrana extracelular (Vijayakumar & Saravanan, 2015). De forma general, los biosurfactantes presentan diversas propiedades, como las observadas en la Tabla 9.

Tabla 9. Propiedades de las moléculas biosurfactantes.

Características	Propiedades de interés
Los niveles de concentración micelar crítica (CMC) son relativamente bajos.	Puede disminuir las tensiones superficiales e interfaciales.
Su actividad superficial es alta.	Presenta bajos niveles de humectación y penetración.
Presenta una adsorción gradual y actividad continua.	Su crecimiento microbiano mejora.
Presentan baja toxicidad y formación de espumas.	Realizan acciones como la hidrofilidad e hidrofobicidad.
Son biodegradables y biocompatibles.	Pueden secuestrar metales y realizar acción antimicrobiana.

Fuente propia

2.2.2.7. Principales Bacterias Productoras de Biosurfactantes. Las bacterias productoras de biosurfactantes se pueden evidenciar en la siguiente tabla:

Tabla 10. Bacterias productoras de biosurfactantes.

Especie bacteriana	Tipo de Biosurfactante	Autor
<i>Pseudomonas sp</i>	Artrofactina	(Toribio et al., 2014)
<i>Pseudomonas maltophila</i>	Biosur - Pm	(Niño, 2019)(Raiger Iustman & López, 2009)
<i>Pseudomonas corrugate</i>	Corrugatina	(Toribio et al., 2014)
<i>Pseudomonas syringae</i> MSU 16H	Pseudomicina A	(Toribio et al., 2014) (Di Giorgio, Camoni, Marchiafava, & Ballio, 1997)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DR54	Viscosina y viscosinamina	(Toribio et al., 2014) (Janek, Mirończuk, Rymowicz, & Dobrowolski, 2020)

<i>Pseudomonas putida</i> PCL1445	Putisolvina I y II	(Toribio et al., 2014) (Eyiwumi Oni et al., 2020)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B301D	Iringomicina y siringopeptina	(Toribio et al., 2014)
<i>Pseudomonas</i> sp DSS73	Amphisina	(Toribio et al., 2014) (Loiseau et al., 2018)
<i>Pseudomonas koreensis</i> 2.74	Lokisina	(Toribio et al., 2014)
<i>Pseudomonas entomophila</i>	Entolisina	
<i>Pseudomonas</i> sp WJ6	Surfactina, fenhicina y lichenisnina	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ramnosil- β - hidroxidecanoil- β - hidródecanoato (monoramnolípido) y el ramnosil-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β - hidródecanoato (diramnolípido).	(Toribio et al., 2014) (Vijayakumar & Saravanan, 2015)
<i>Serratia rubidea</i>	Ramnolípido	(Niño, 2019)
<i>Arthrobacter paraffineus</i>	Trehalolípidos	
<i>Lactobacillus fermentii</i>	Diglicosil diglicéridos	
<i>Arthrobacter</i> sp.	Artrofactina	
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lichenisina A, Lichenisina B	(Vijayakumar & Saravanan, 2015) (Niño, 2019)
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactina	(Vijayakumar & Saravanan, 2015) (Niño, 2019)
<i>Bacillus pumilus</i>	Surfactina	(Niño, 2019)
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Sulfonilípidos	
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Emulsan, Alasan	(Niño, 2019) (Raiger Iustman & López, 2009)

<i>Bacillus</i> strain	Lipopéptidos	(López, Martínez, & Rodríguez, 2019)
<i>Acinetobacter</i> spp	Fosfatidiletanolamina	(Vijayakumar & Saravanan, 2015)
<i>Acinetobacter</i> spp. HO1-N	Biosurfactantes particulados	(Vijayakumar & Saravanan, 2015)

Fuente propia

2.2.3. Era antropogénica: problemática actual

Los hidrocarburos son compuestos semivolátiles que se mueven entre la atmósfera y la superficie de la Tierra, considerándose como contaminantes persistentes en ecosistemas terrestres, acuáticos y aéreos (Das et al., 2014; Quijano et al., 2017), donde los animales suelen poseerlos al tener contacto dérmico e ingestión o inhalación. Así mismo, en seres humanos pueden atravesar rápidamente las membranas celulares al ser liofílicos persistiendo de forma indefinida, causando efectos respiratorios, cardiovasculares, gastrointestinales, hematológicos, hepáticos, neurológicos y reproductivos (Das, et al., 2014). Por lo anterior, han generado una gran problemática ambiental y sanitaria en los últimos años, debido a sus efectos mutagénicos y cancerígenos en los seres humanos (Shukla, Mangwani, Rao & Das, 2014).

Así mismo, la presencia de hidrocarburos en fuentes hídricas inhibe el desarrollo de la fotosíntesis al impedir la penetración de luz e intercambio de gases, permitiendo la solubilización de sustancias que afectan a especies como el plancton y los microinvertebrados (Velásquez, 2016); cuando los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH) provienen de derrames de petróleo son llamados **petrogénicos**, mientras que, si se producen por la quema de combustibles fósiles e incendios forestales son llamados **pirogénicos** (Amaringo et al., 2019). Los compuestos **pirogénicos** de 10nm tienden a volatilizarse y distribuirse en el aire, acumulándose

en el flujo vehicular o transportándose a fuentes hídricas a través de la lluvia, causando de esta manera una transferencia entre aire, agua y suelo (Amaringoa et al., 2019). Actualmente, la principal fuente de producción de HAP son los escapes de los motores de los vehículos (Quijano et al., 2017), considerándose como altamente hidrófobos y lipofílicos, adsorbiéndose y acumulándose en la superficie del suelo y tejidos corporales de mamíferos ricos en lípidos. Es por ello que, estos compuestos hidrocarbonados, resultan ser recalcitrantes, difíciles de degradar en suelos contaminados y peligrosos para la salud humana debido a su persistencia, toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad (Das, Raj, Mangwani, Dash, & Chakraborty, 2014; Mendoza, 2018).

Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA) regulan el control de estas sustancias en el medioambiente (Romaniuk et al., 2018), donde los principales países encargados en diseñar políticas para el tratamiento y remoción de hidrocarburos son EUA, Canadá, Holanda y Alemania (Mendoza, 2018); identificados como prioritarios al naftaleno ($C_{10}H_8$), acenafteno ($C_{12}H_{10}$), acenaftileno ($C_{12}H_8$), fluoreno ($C_{13}H_{10}$), fenantreno ($C_{14}H_{10}$), antraceno ($C_{14}H_{10}$), fluoranteno ($C_{16}H_{10}$), pireno ($C_{16}H_{10}$), benz(*a*)antraceno ($C_{18}H_{12}$), criseno ($C_{18}H_{12}$), benzo(*b*)fluoranteno ($C_{20}H_{12}$), benzo(*k*)fluoranteno ($C_{20}H_{12}$), benzo(*a*)pireno ($C_{20}H_{12}$), dibenzo(*ah*)antraceno ($C_{22}H_{14}$), benzo(*ghi*)perileno ($C_{22}H_{12}$), indeno(1,2,3,*cd*)pireno ($C_{22}H_{12}$)” (Das et al., 2014; Quijano et al., 2017; Mendoza, 2018).

2.3. Marco Legal

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) fue firmado el 5 de junio de 1992 en la Cumbre de la Tierra celebrada en Río de Janeiro, y entró en vigor el 29 de diciembre de 1993. Es un tratado internacional que incluye tres objetivos principales: la conservación de la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes y la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos. Además, tiene como finalidad el desarrollo de un futuro sostenible mediante la conservación de la diversidad biológica (ecosistemas, animales, plantas, hongos, microorganismos y diversidad genética). Tiene como visión para 2050, la utilización adecuada y conservación de la diversidad biológica que permita mantener la sostenibilidad del planeta; así mismo, en la misión se tiene previsto que para el año 2020 los ecosistemas puedan seguir otorgando beneficios a los seres vivos, contribuyendo al bienestar y a la erradicación de la pobreza (Carrillo et al., 2015; The Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2017).

El Convenio de Basilea es un Acuerdo Multilateral sobre Medio Ambiente (AMUMA), fue adoptado por 170 países dentro del sistema de Naciones Unidas el 22 de marzo de 1989 y cobro vigencia el 22 de marzo de 1989. Es el encargado de proteger al medio ambiente y la salud humana de los efectos nocivos de la producción, manejo y distribución de los desechos peligrosos (toda sustancia no degradable que constituye un peligro potencial a la salud humana o a organismos vivos). Su principal objetivo es asegurarse de que los países realicen una correcta disposición final de los desechos peligrosos, eliminándolos lo más cerca posible del lugar donde se generen, disminuyendo su capacidad de dispersión. En Colombia mediante la Ley 253 de 1996

se dio paso a la aprobación del Convenio de Brasilea, que se destaca por ser el primero y único tratado internacional en materia de desechos peligrosos (Chaves, 2017; Sarmiento, 2019).

El Protocolo de Kioto fue inicialmente adoptado el 11 de diciembre de 1997 en Kioto, Japón, pero entró en vigor hasta 2005. Por el momento, continúa siendo vigente hasta diciembre de 2020. Es el encargado de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) para contribuir a la disminución del cambio climático. Establece leyes y políticas para gobiernos y empresas con el fin de que cumplan los compromisos ambientales (Sarmiento, 2019; Zambrano, 2019).

Los Objetivos de Desarrollo Sostenible, también conocidos como **Objetivos Mundiales**, se adoptaron por todos los Estados Miembros en 2015 para poner fin a la pobreza, proteger el planeta y garantizar que todas las personas gocen de paz y prosperidad para 2030. En total son 17 objetivos, dentro de los cuales 7 de ellos están directamente relacionados con la problemática a tratar en el presente trabajo de investigación, siendo: 2) Hambre cero; 3) Salud y bienestar; 7) energía asequible y no contaminante; 11) ciudades y comunidades sostenibles; 12) producción y consumo responsables; 13) acción por el clima y 15) vida de ecosistemas terrestres (ONU, 2015; Gómez, 2017).

La Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Humano (Conferencia de Estocolmo) fue celebrada en Estocolmo, Suecia desde el 5 al 16 de junio de 1972 (Gorosito, 2017; Sarmiento, 2019). Acordó una Declaración de 7 puntos y una Resolución de 26 principios. En la presente investigación se tendrán en cuenta los siguientes principios (Gorosito, 2017):

➤ **Principio 1.** El hombre tiene el derecho fundamental a gozar de bienestar en un ambiente de calidad tal que le permita llevar una vida digna. Así mismo, tiene la

solemne obligación de proteger y mejorar el medio ambiente para las generaciones presentes y futuras.

➤ **Principio 2.** Los recursos naturales de la tierra (aire, agua, tierra, flora y fauna) deben preservarse en beneficio de las generaciones presentes y futuras.

➤ **Principio 3.** La capacidad de la tierra para producir recursos vitales renovables debe mantenerse y, siempre que sea posible, restaurar o mejorar.

➤ **Principio 5.** Los recursos no renovables de la Tierra deben emplearse evitando el peligro de su futuro agotamiento, para asegurar que los beneficios sean compartidos por toda la humanidad.

➤ **Principio 6.** La descarga de sustancias tóxicas o de otras debe detenerse con el fin de garantizar que no ocurran daños graves o irreversibles en los ecosistemas.

➤ **Principio 12.** Los recursos naturales se deben preservar para mejorar el medio ambiente.

➤ **Principio 13.** Los Estados deben implementar planes de desarrollo para garantizar la protección y mejoramiento del medio ambiente.

➤ **Principio 20.** Los países deben promover el desarrollo y la investigación científica que puedan solucionar los problemas ambientales.

El Protocolo de Louisiana 29B, es una norma ambiental internacional implementada en Colombia, que consta de 25 capítulos, destacándose el capítulo 3 “Control de la contaminación – Almacenamiento in situ, Tratamiento y Disposición de residuos de Exploración y Producción (residuos E & P) generados de Perforación y Producción de Petróleo y Pozos de gas”, en el cual

se regulan los parámetros permisivos para el manejo de los residuos en las fases de exploración y producción por parte de las industrias de hidrocarburos (Soto, 2017; Castaño, 2018).

En la tabla 13, se establecen los límites permisibles de los parámetros de metales e hidrocarburos totales de petróleo (TPH), para estabilización de lodos y suelos contaminados.

Tabla 11. Parámetros permisibles de los metales e hidrocarburos totales de petróleo (TPH).

PARÁMETROS	VALOR
pH	6.0 – 9.0
Conductividad eléctrica	< 4.0 ohm/cm
Relación de absorción de sodio	< 12.0
Porcentaje de sodio intercambiable	< 15.0 %
Grasas y aceites	≤ 1.0 %
Arsénico	10.0 mg/kg
Bario	20000.0 mg/kg
Cadmio	10.0 mg/kg
Plomo	500.0 mg/kg
Mercurio	500.0 mg/kg
Selenio	10.0 mg/kg
Plata	200.0 mg/kg
Zinc	500.0 mg/kg

Fuente: (Informe de monitoreo de suelos, 2014; Soto, 2017)

En 1961 se llevo a cabo en Alemania la **primera legislación referente a la biodegradabilidad de los tensoactivos**, la cual exigía que los tensoactivos aniónicos fuese biodegradado en un porcentaje del 80% (biodegradación primaria). Posterior a ello en el 2004 se promulgaron gran cantidad de leyes referentes a la regulacion y uso de los tensoactivos con el fin de resolver las problemática ambientales, lo que implicó crear reglamentos para mejorar la claridad

y racionalidad de dichas leyes (Catarero, 2010; Fernández, 2011). Estos reglamentos se pueden observar en la Tabla 14.

Tabla 12. Normativa internacional sobre tensoactivos y medio ambiente.

Reglamentación	Tema
Reglamento (CE) n° 648/2004	Parlamento europeo y del consejo de 31 de marzo de 2004 sobre detergentes
Reglamento (CE) n° 1336/2008	Clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezcla
Reglamento (CE) n° 219/2009	Procedimiento de reglamentación con control
Reglamento (CE) n° 259/2012	Uso de fosfatos y otros compuestos de fósforo en detergentes
Reglamento (CE) n° 907/2006	Métodos de ensayo de biodegradabilidad, Etiquetado y hoja informativa de ingredientes
Reglamento (CE) n° 551/2009	Lista de tensoactivos objetos de excepción y detergentes prohibidos / limitados.

Fuente propia

El Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología, cubre todos los posibles dominios que están directa o indirectamente relacionados con la diversidad biológica y su papel en el desarrollo, desde la ciencia, la política y la educación hasta la agricultura, los negocios, la cultura y mucho más. En la 10ª Reunión de la Conferencia de las Partes (COP), celebrada en Cartagena del 17 al 21 de octubre de 2010, se llevó a cabo la “Declaración de Cartagena” relacionada con la prevención, minimización y recuperación de desechos peligrosos (Bernal, Galán, & Villa, 2011; Pérez, 2017).

El Consejo Nacional Ambiental aprobó el 16 de diciembre de 2005, la **Política Ambiental para la Gestión Integral de los Residuos o Desechos Peligrosos**. Ese mismo año entró en vigencia el Decreto 4741: “Por el cual se reglamenta parcialmente la prevención y el manejo de los residuos o desechos peligrosos generados en el marco de la gestión integral” (Trujillo & Ramírez, 2012).

La Constitución Política de Colombia de 1991 presenta artículos con relación directa a la contaminación de hidrocarburos, entre los cuales se destacan: Art. 8. Riquezas culturales y naturales de la Nación; Art. 79. Ambiente sano; Art. 80. Planificación del manejo y aprovechamiento de los recursos naturales; Art. 95. Protección de los recursos culturales y naturales del país. Así mismo, se menciona al recurso suelo en los artículos: Art. 360. Explotación de un recurso natural no renovable; Art. 361. Conocimiento y cartografía geológica del subsuelo; Art. 366. Mejoramiento de la calidad de vida de la población (Suarez, 2013). La tabla 15 representa las principales normas implementadas en Colombia.

Tabla 13. Principales normas implementadas en Colombia para el mantenimiento y protección del recurso suelo.

Norma	Objetivos
Decreto ley 2811 de 1974 Principales Artículos: 8; 182-186; 324-326	Código Nacional de Recursos Naturales Renovables y de Protección al Medio Ambiente
Ley 99 de 1993	Creación del Ministerio del Medio Ambiente y Organiza el Sistema Nacional Ambiental (SINA)
Decreto 1753 de 1994	Licencia ambiental LA
Decreto 2150 de 1995	Reglamentación de la licencia ambiental
Decreto 4741 de 2005 Principales Artículos: 10 # (h); 16 # (e); 17 # (g).	Plan Nacional de Contingencia contra derrames de Hidrocarburos, Derivados y Sustancias Nocivas
Decreto 321 de 1999	Plan Nacional de Contingencia contra derrames de Hidrocarburos, Derivados y Sustancias Nocivas

Ley 2 de 1999	Reserva forestal y protección de suelos y aguas
Decreto 1594 de 1984	Normas de vertimientos de residuos líquidos
Ley 388 de 1997	Ley de ordenamiento territorial para la reglamentación de los usos del suelo

Fuente propia

La Política Nacional para la Gestión Integral Ambiental del Suelo (GIAS) se desarrolló en el año 2011 mediante convenio MADS – IDEAM y, tiene como objetivo contribuir a la conservación y uso sostenible del suelo preservando la biodiversidad y sus servicios ecosistémicos (Ministerio del medio ambiente y desarrollo sostenible, 2013). La tabla 16 representa el anexo 2 del libro VI del texto unificado de legislación secundaria del ministerio del ambiente: norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados, establece los criterios de calidad del suelo.

Tabla 14. Parámetros para la calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados.

Parámetro	Unidades*	Valor
<i>Parámetros Generales</i>		
Conductividad	uS/cm	200
pH		6 a 8
Relación de adsorción de Sodio (Índice SAR)		4*
<i>Parámetros inorgánicos</i>		
Arsénico	mg/kg	12
Azufre (elemental)	mg/kg	250
Bario	mg/kg	200
Boro (soluble en agua caliente)	mg/kg	1
Cadmio	mg/kg	0.5
Cobalto	mg/kg	10

Cobre	mg/kg	25
Cromo Total	mg/kg	54
Cromo VI	mg/kg	0.4
Cianuro	mg/kg	0.9
Estaño	mg/kg	5
Fluoruros	mg/kg	200
Mercurio	mg/kg	0.1
Molibdeno	mg/kg	5
Níquel	mg/kg	19
Plomo	mg/kg	19
Selenio	mg/kg	1
Vanadio	mg/kg	76
Zinc	mg/kg	60
<i>Parámetros orgánicos</i>		
Benceno	mg/kg	0.03
Clorobenceno	mg/kg	0.1
Etilbenceno	mg/kg	0.1
Estireno	mg/kg	0.1
Tolueno	mg/kg	0.1
Xileno	mg/kg	0.1
PCBs	mg/kg	0.1
Clorinados Alifáticos (cada tipo)	mg/kg	0.1
Clorobencenos (cada tipo)	mg/kg	0.05
Hexaclorobenceno	mg/kg	0.05
Hexaclorociclohexano	mg/kg	0.01
Fenólicos no clorinados (cada tipo)	mg/kg	0.1
Clorofenoles (cada tipo)	mg/kg	0.05

Hidrocarburos totales (TPH)	mg/kg	<150
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)	mg/kg	0.1
cada tipo		

Fuente: (Ministerio del medio ambiente y desarrollo sostenible, 2013).

El Ministro de Salud y Protección Social y el Ministro de Ambiente y Desarrollo Sostenible, mediante la resolución 689 de 2016 adopta “el reglamento técnico que establece los límites máximos de fósforo y la biodegradabilidad de los tensoactivos presentes en detergentes y jabones, y se dictan otras disposiciones” (Ministerio de salud y protección social, 2016).

La Corporación Autónoma Regional de la Frontera Nororiental (CORPONOR), ratifica en la Resolución N° 256 del 2020 su gestión frente a los sistemas de calidad ambiental, previniendo y mitigando el impacto ambiental negativo provocado en el desarrollo de las actividades, productos y servicios llevados a cabo por el hombre (Corporación Autónoma Regional De La Frontera Nororiental -CORPONOR, 2020).

Así mismo, en la **Resolución N° 539 del 2012** regula la compensación ambiental para las licencias ambientales otorgadas a las empresas de explotación minera (Corporación Autónoma Regional De La Frontera Nororiental -CORPONOR, 2012).

La **Resolución 2162 del 2017**, establece una solicitud de Acceso a Recursos Genéticos y Productos Derivados para el programa denominado “Biotecnología y Biodiversidad microbiana” llevado a cabo por la Corporación para la Investigación de la Corrosión (C.I.C.). Este busca implementar una estrategia de bioprospección y comercialización de biocatalizadores haciendo uso de la Biotecnología para lograr una independencia económica (Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible, 2017).

Teniendo en cuenta la reglamentación mencionada anteriormente, no fue posible encontrar normativas a nivel regional y nacional sobre la producción, uso y control de biosurfactantes en ambientes contaminados con hidrocarburos.

3. Metodología

La siguiente metodología se propone para la revisión de investigaciones enfocadas en bacterias hidrocarbonoclastas y su potencial biotecnológico en la producción de moléculas biosurfactantes con el interés de próximas investigaciones en campo para la biorremediación de suelos afectados por estas sustancias.

El propósito específico es el análisis e interpretación del potencial biosurfactante de bacterias hidrocarbonoclastas en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en la presente era antropogénica teniendo en cuenta la panorámica y los desafíos nacionales.

3.1. Tipo de Investigación

Este proyecto de investigación es de tipo monográfico, descriptivo y exploratorio, encargado del análisis documental referente al aislamiento, caracterización fenotípica e identificación molecular de microorganismos con potencial biosurfactante en suelos contaminados por hidrocarburos y su papel en la era antropogénica.

3.2. Método de Investigación

3.2.1. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

Para el desarrollo de este trabajo monográfico se emplearon fuentes de información de tipo secundarias, tales como libros, periódicos, trabajo de grados, artículos científicos y de revisión.

3.2.2. Técnicas para la Presentación de Datos, Tablas y Gráficos Estadísticos.

La información recolectada se organizó empleando tablas, fichas de barrido documental y gráficos de barras para una mayor comprensión. Así mismo, se utilizaron algunos softwares estadísticos y programas de diseño para reforzar la visualización de los resultados obtenidos.

3.2.3. Fuentes de Información.

Para la selección de la información se emplearon bases de datos como WEB OF SCIENCE y IEEE XPLORE disponibles en la biblioteca virtual de la universidad Francisco de Paula Santander. Así mismo, SCIELO, SCIENCEDIRECT, ELSERVIER, GOOGLE ACADÉMICO, DIALNET y REDALYC. Se consultaron los repositorios pertenecientes a la Universidad Francisco de Paula Santander sede Ocaña, Universidad Industrial de Santander, Fundación Universidad de América, Universidad de Granada, Instituto Politécnico Nacional de México, entre otros, para la obtención de tesis de pregrado y posgrado relacionadas con la biorremediación de hidrocarburos. Como segunda fuente de información se emplearon páginas oficiales de entes reconocidos como son la Corporación autónoma regional de la Frontera Nororiental (CORPONOR) y la Environmental Protection Agency (EPA).

3.3. Hipótesis

Mediante recolección de información científica es posible resumir, categorizar y analizar estudios recientes sobre la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos mediada por bacterias hidrocarbonoclastas, discutiendo sus características y mecanismos asociados a la producción de biosurfactantes, pudiendo describir su potencial biotecnológico y su impacto en la presente era antropogénica.

4. Obtención de Bacterias con Potencial Biosurfactante Empleadas en Procesos de Biorremediación en Suelos

4.1. Muestreo y Caracterización de la Zona Afectada

La elaboración de un plan de muestreo, es esencial, en toda investigación que requiera la toma de muestras de cierta zona contaminada. Este plan permite determinar las áreas que presentan potencial interés, proporcionando el número mínimo de puntos a muestrear y delimitando la zona afectada (Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca –CAR, 2018).

Para la recolección de la información general del terreno, es importante conocer el número de identificación del punto de muestreo, la fecha (día, mes, año) y, la unidad de susceptibilidad de degradación por erosión y/o salinización, según el análisis de la información del estudio de suelos. Así mismo, es importante tener la localización exacta del lugar objeto de estudio al nombrar el departamento, municipio, vereda y el sitio preciso en donde se ha derramado crudo, también se debe realizar una georreferenciación mediante coordenadas geográficas o planas; por último, se debe recolectar un contacto (propietario, encargado o asistente técnico de la finca, etc.) en caso de necesitar algunos datos de importancia. Por otro lado, se debe realizar una descripción detallada del lugar donde se encuentra la muestra, mediante la obtención de datos como la geomorfología, en donde se debe describir el paisaje, el tipo de relieve, la forma, la longitud e inclinación de la pendiente; también se debe mencionar el clima de la zona para poder precisar la humedad y la temperatura del lugar. Por último, es fundamental conocer si el suelo es empleado para actividades agrícolas (cultivos semestrales, anuales, bianuales, perennes), ganaderas (extensiva, intensiva, confinada), mineras, urbanas, industriales o cualquier otro uso, reportando las prácticas de manejo

que se llevan a cabo en este lugar, tales como mecanización agrícola, fertilización, riego, drenaje, entre otros (Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca –CAR, 2018)

Una vez se ha detallado y caracterizado la zona contaminada, se debe realizar el diseño de un sistema de muestreo que pueda ser representativo y que permita la toma de muestras homogéneas o similares, para esto se lleva a cabo un análisis de representatividad espacial, en donde se ubican las posibles zonas de muestreo y se determinan los transectos, teniendo en cuenta la accesibilidad de trabajo y, la representatividad de las unidades. Se debe tener en cuenta que en las zonas de muestreo se puedan evidenciar las vías de acceso y la heterogeneidad de las unidades, para así, determinar los sitios de muestreo. Una vez se han identificado los sitios de muestreo, los mismos deben ser ubicados dentro de los transectos empleando el método de red rígida, que es usada en mapas con escala de gran detalle, en donde se verifican unidades cartográficas (Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca –CAR, 2018). En la georreferencia de la zona de muestreo se pueden emplear herramientas visuales como Google Maps, Google Earth, GPS o algunos Software específicos como gvSIG, Georefencer, ArcView, entre otros. Como ejemplo, se anexa la figura 1 que permite evidenciar la ubicación satelital de la Vereda Campo Alegre, perteneciente al Municipio de Toledo, Norte de Santander, donde se presentaron derrames de petróleo crudo en el suelo.

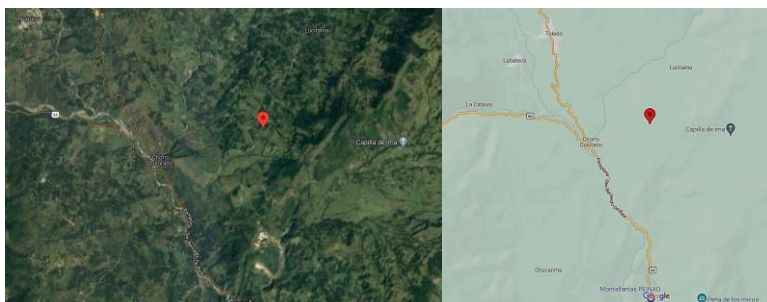


Figura 1. Ubicación Satelital de la Zona Afectada en la Vereda Campo Alegre ($7^{\circ}16'27.3''N$ $72^{\circ}26'36.2''W$)

Nota. Fuente propia

Uno de los aspectos a tener en cuenta es el tamaño de muestra, ya que, cuando es insuficiente para desarrollar la investigación propuesta, no se podrían dar conclusiones sólidas, pues siempre se mantendrá incertidumbre en los resultados obtenidos, algo que no beneficiaría a los autores del trabajo de investigación ni al público susceptible. Por otro lado, cuando el tamaño de muestra es superior al requerido, se incurren en gastos innecesarios de tiempo, dinero, esfuerzo, materiales, reactivos y personal (Rendón et al., 2017).

Uno de los métodos que se puede emplear para saber el tamaño de la muestra en una investigación es mediante la Teoría de Gy para el “muestreo de materiales particulados” que provee las bases requeridas para definir el tamaño necesario para caracterizar un material como el suelo; esto se logra relacionando el tamaño de partícula de un material con el tamaño de la muestra a tomar para la unidad que se desea evaluar. Por consiguiente, la cantidad de suelo que se va a recolectar por cada muestra depende de distintos factores, tales como: el sitio a muestrear, el diseño de muestreo seleccionado, el tipo de muestras (simple o compuesta), la exactitud y precisión y, los recursos económicos disponibles. Por último, la cantidad de suelo para cada muestra se puede determinar por el tipo y número de parámetros a analizar, tal como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Cantidad de Muestra Requerida Según el Análisis a Realizar

Análisis	Muestra (g)
Caracterización química: carbono orgánico, pH, ClC, Ca, Mg, N, P y K	500
Caracterización física: textura, densidad	500-2000
Contaminantes inorgánicos: principalmente metales	150

Microbiológico (bacterias y hongos)	100
-------------------------------------	-----

Nota. Fuente: (Volke et al., 2005).

En otras ocasiones, se puede emplear la ecuación 1 para determinar el tamaño de la muestra contaminada con hidrocarburos en un muestreo aleatorio simple, utilizando la Ecuación 1.

$$n = \frac{Z^2 * p * q * N}{N * E^2 + Z^2 * p * q} \quad (1)$$

Donde N es el tamaño de la población, Z es el nivel de confianza, E es error o precisión, p es la proporción esperada, q es 1 menos p y, n representa al tamaño de la muestra (E. P. Rodríguez, 2018). Además, en un trabajo de investigación descrito por Ramírez et al., (2002) indicaron que el tamaño de la muestra se determina empleando un muestreo estratificado, estableciendo un primer estrato con referencia al suelo utilizado para actividades agrícolas y, un estrato dos para un suelo con uso potencial de agostadero, realizando análisis de varianza para cada estrato permitiendo tener un control de calidad al agregar un 10% de muestra al tamaño real.

Además, es importante señalar que previo a la toma de muestras se recomienda que los materiales a emplear sean esterilizados en autoclave; así mismo, las personas encargadas de realizar esta labor deben utilizar elementos de protección personal como guantes, casco y protectores visuales para evitar la contaminación de las muestras a analizar en laboratorio.

4.1.1. Toma de Muestra en Suelos Contaminados con Hidrocarburos

Como ya se mencionó, antes de realizar cualquier procedimiento se debe georreferenciar la zona de muestreo, definiendo y caracterizando el lugar afectado, limpiando y eliminando cualquier resto de materia orgánica que se encuentre en la superficie del suelo. Posteriormente, se debe realizar un muestreo en el lugar contaminado que puede ser de tipo aleatorio simple, zigzag o lineal.

Dentro del área contaminada, se seleccionan entre 3, 6, 8 o 10 puntos de muestreo, que pueden ser perforados con materiales como la barrena Riverside, espátula o pala. Las muestras suelen recolectarse a diferentes profundidades desde 5cm hasta 60cm, clasificándose como simples cuando se recolectan a partir de una sola extracción o compuestas cuando se realiza la mezcla de varias muestras simples (Sosa, 2012)¹³; Moreno & Abasolo, 2019); cabe resaltar que cantidad de muestras a procesar dependerá (Aguilar, 2013; Moreno & Abasolo, 2019) del total de procedimientos a realizar en el laboratorio.

Además, en cada punto de muestreo se recomienda evaluar parámetros fisicoquímicos in situ, como el pH y la temperatura (Briseño, 2018). Para el primero se recomienda el uso del peachímetro (Briseño, 2018) o tiras de papel tornasol y, para la temperatura se emplea usualmente un termómetro de mercurio, realizando su lectura como se observa en la figura 2 (Moreno & Abasolo, 2019).



Figura 2. Medición de la Temperatura In Situ

Nota. Fuente: (Moreno & Abasolo, 2019).

Una vez recolectadas todas las muestras a procesar, se almacenan (Moreno & Abasolo, 2019) en bolsas de polietileno, recipientes de polipropileno o frascos de vidrio ámbar, la elección dependerá de las disponibilidades que presente cada investigador (Becerra & Horna, 2016; Briseño, 2018; Mondragón, 2011; Moreno & Abasolo, 2019; Ordoñez et al., 2018). Seguidamente, se realiza su debido etiquetado teniendo en cuenta los datos requeridos como número de muestra, peso, ubicación y fecha. Por último, para conservarlas durante su transporte son almacenadas en un cooler o refrigeradora portátil capaz de mantener una temperatura de 4°C hasta su llegada al laboratorio para su análisis y procesamiento dentro de las próximas 24 horas (Liporace, 2018).

4.2. Aislamiento de Microorganismos Presentes en Suelos Contaminados con Hidrocarburos

En los suelos, los microorganismos cumplen un papel fundamental en el mantenimiento de los ciclos biogeoquímicos y transformación de nutrientes (Luna et al., 2017). No obstante, su trabajo se imposibilita en suelos con presencia de hidrocarburos que modifican diversos parámetros fisicoquímicos como el pH, temperatura, humedad, conductividad eléctrica y concentración de iones (Esquivel et al., 2018). El aislamiento de microorganismos capaces de sobrevivir en estas condiciones resulta en una tarea compleja para diversos investigadores en todo el mundo.

En la naturaleza, los microorganismos se encuentran en consorcios formados por colonias de diversos microorganismos; sin embargo, para su posterior estudio y análisis en el laboratorio, se requiere la obtención de los mismos en cultivos puros mediante la selección de diferentes medios de cultivos, encargados de suministrarles los nutrientes óptimos para su crecimiento, generándoles un ambiente favorable para su correcto desarrollo (Gil et al., 2021). Cabe resaltar

que, las características del medio de cultivo determinarían la eficiencia de los microorganismos para crecer en el mismo, teniendo en cuenta variables como salinidad, pH y capacidad metabólica para la asimilación de los nutrientes en el medio (Catalán et al., 2017)

4.2.1. Técnica de Enriquecimiento

En el aislamiento de las bacterias hidrocarbonoclastas con potencial biosurfactante, la técnica de medios de cultivos enriquecidos es ampliamente utilizada. En esta metodología al medio de cultivo se le añade un hidrocarburo, ya sea de tipo comercial como el Diesel o del mismo hidrocarburo obtenido en la zona de muestreo, a partir del cual, el microorganismo empleará como fuente de carbono y energía para desarrollarse correctamente.

A continuación, se detallan los medios de cultivo que se usan como base para la técnica de enriquecimiento con la respectiva metodología reportada por diversos autores.

4.2.1.1. Medio Mínimo Salino (MSM). Es usualmente empleado en la técnica de enriquecimiento de suelo contaminado con petróleo para la obtención de aislados bacterianos con potencial biosurfactante (Pacwa et al., 2014). Para el aislamiento de las cepas se toma 1 gr de suelo y se agrega en un Medio Mínimo Salino (MSM) con un 2% (v/v) de petróleo crudo como fuente de carbono manteniendo un pH del medio de $7,0 \pm 0,2$; luego se incuba a 25 °C durante 7 días en un shaker rotatorio a 150 rpm (Hanano et al., 2017a; Patowary et al., 2017a). Después de la inoculación, se pueden sembrar 10 ml del inóculo en placas de Petri que contienen 10 ml de MSM con 20g/l de Agar y el petróleo crudo como fuente de carbono, durante 72 horas a 25°C (Liporace et al., 2019; Liporace, 2018) realizando el proceso por triplicado para obtener colonias más puras.

4.2.1.2. Medio Luria Bertani (LB). Este medio de cultivo permite el desarrollo de diversas cepas microbianas, ya que, presenta gran contenido de nutrientes. Los autores Becerra & Horna, (2016) realizaron una investigación para el aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos, donde agregaron 10 gramos de suelo con residuos de hidrocarburos (10%) en 100 ml de diferentes Caldos planteados en su investigación, como Caldo Luria Bertani (LB) más emulsión de yema de huevo al 5%, Caldo Luria Bertani más petróleo al 5% y, Caldo Luria Bertani más glicerol al 5%. Posteriormente incubaron a 30°C durante 72 horas y a 120 rpm. Luego de la incubación, realizaron diluciones seriadas en cada uno de los caldos y finalmente se sembraron en placas con Agar Caso.

4.2.1.3. Agar Nutritivo (AN). Es utilizado para el aislamiento de microorganismos que presentan escasos requerimientos nutricionales. En una investigación desarrollada por Ali Khan et al., (2017) cuyo objetivo fue investigar el potencial de cuatro cepas bacterianas en la producción de biosurfactantes y la degradación de hidrocarburos, realizaron un tamizado en las muestras de suelo a 2 mm en placas de Agar Nutritivo (AN) modificado con aceite Diesel esterilizado con filtro al 1% y 100 g/l de Fluconazol para evitar el crecimiento de hongos, posteriormente inocularon las cepas en caldo de Bushnell Haas (BHB), en condiciones estáticas a 30°C, esto se hizo por triplicado. Después de ello, se modificó el medio BHB con tres fuentes de carbono diferentes (Diesel, crudo y aceite gastado de motor), para evaluar el crecimiento de cada cepa después de 13 días de incubación a 30 °C.

4.2.2. Técnica por Diluciones

La separación física de los microorganismos mediante diluciones seriadas es otra técnica de aislamiento microbiano, donde se toman 5 gramos del suelo que contiene el hidrocarburo y se inocula a 50 ml en caldo R2B a 25°C por 72 horas. Seguido del tiempo de incubación, se toma 1 ml del caldo y se realiza una dilución en serie de 10^{-1} a 10^{-9} en agua destilada estéril efectuando la siembra al incorporar 20 ml de la última disolución en Agar papa dextrosa y caldo R2B, por 48 horas a 30 y 25 °C respectivamente (Aguilar, 2013). Otra metodología propuesta consiste en agregar 1 ml del inóculo a 100 ml de MSM frescos e incubar a 35°C durante 7 días; al finalizar los 7 días, se toma 1 ml del inóculo para realizar diluciones seriadas de 10^{-4} y 10^{-6} en placas de Agar Nutritivo, incubándose a 35°C durante 24 horas, realizando el proceso por triplicado (Patowary et al., 2017). Así mismo, en el estudio desarrollado por Moreno & Abasolo, (2019) para el aislamiento de la flora bacteriana presente en el suelo contaminado con petróleo, se agregaron 5 gr de suelo en 50 ml de agua destilada estéril y realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-5} , luego tomaron 100 µl de las diluciones 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-5} y las sembraron en placas con medio de cultivo PCA suplementado con diésel e incubando a la temperatura de la zona de muestreo (24°C) durante 48 horas, este procedimiento se hizo por duplicado.

4.3. Purificación Y Obtención De Microorganismos Presentes En Suelos Contaminados

Con Hidrocarburos

Generalmente, la purificación de los aislados se realiza al cultivarlos en Medio Mínimo Salino (MMS) modificando su fuente de carbono, agregando 1ml del hidrocarburo al 2% v/v; se

incuban por 7 días a temperatura ambiente con agitación de 115rpm y se realizan observaciones en la turbidez del medio, clasificando el nivel con cruces (+)(Mondragón, 2011; Santos, 2017). Algunos autores emplean el Agar petróleo para identificar las bacterias degradadoras del hidrocarburo y, así obtener colonias especializadas (Moreno & Abasolo, 2019), sumado al Agar Cromogénico, Cetrimide y Luria-Bertani (LB) (Moreno & Abasolo, 2019) específicos para identificar algunos géneros bacterianos (Hanano et al., 2017; Quispe, 2019). De igual forma, el crecimiento celular puede ser determinado mediante la producción de biomasa durante 14 días, empleando el espectrofotómetro con una densidad óptica de 600 nm (Liporace, 2018; Ordoñez et al., 2018).

4.3.1. Identificación Macroscópica, Microscópica y Bioquímica

La identificación microbiana mediante la caracterización morfológica de las colonias bacterianas presentes en los diferentes medios de cultivo permite identificar la taxonomía de los aislados obtenidos (Argoti, 2019). Por lo general, las cepas bacterianas previamente aisladas y purificadas, suelen identificarse macroscópicamente según la elevación, borde y forma de su colonia (Hanano et al., 2017). Además, se requiere realizar la distinción del tipo de pared celular que presentan los aislados obtenidos; para ello, se lleva a cabo la tinción Gram implementando la técnica de Christian Gram (Aguilar, 2013; Quispe, 2019). Para su realización, se toma una asada del cultivo bacteriano y se dispone en un cubre objetos junto con una gota de agua destilada, fijándose al calor. Luego se cubre con el colorante cristal violeta (1 min.), se lava con agua destilada y se agrega el fijador Lugol (1 min.); posteriormente se añade alcohol-acetona (30 seg.), se enjuaga con agua destilada y se agrega el colorante safranina (1 min.). Al finalizar el

procedimiento, las bacterias Gram positivas se observan de un color morado y las bacterias Gram negativas se observarán de color rosado (Briseño, 2018; F. A. Liporace, 2018; Moreno & Abasolo, 2019).

Así mismo, las bacterias presentan la capacidad de crecer sobre diversos sustratos, debido a su versatilidad metabólica (Fernández et al., 2010; Sánchez et al., 2017). Las pruebas bioquímicas permiten identificar las rutas metabólicas que emplea el microorganismo para tolerar diferentes fuentes de carbono mediante la producción de enzimas celulares (Argoti, 2019). Para la caracterización de bacterias capaces de crecer en suelos con presencia de hidrocarburos, se suelen emplear diversas pruebas bioquímicas que incluyen fermentación de carbohidratos, hidrolisis de esculina y gelatina, prueba de urea, indol, descarboxilasa, catalasa y oxidasa; así como la producción de ácido sulfhídrico (H_2S), la siembra en agar LIA, Citrato de Simmons y la inoculación en TSI; teniendo en cuenta parámetros como una temperatura de incubación a $40^{\circ}C$ durante 24h – 48h (Briseño, 2018; Mondragón, 2011; Quispe, 2019; Santos, 2017).

4.4. Caracterización de aislados bacterianos y suelos contaminados con hidrocarburos

Los suelos contaminados con petróleo crudo tienden a presentar pH bajos, esto es debido a la baja concentración de cationes intercambiables o por la liberación de diversos compuestos orgánicos y/o ácidos grasos generados en la biodegradación del hidrocarburo (Zamora et al., 2012). Así mismo, estos suelos poseen una textura franco-arcillo-arenosa con un bajo contenido de carbono orgánico y una disminución de sales solubles (P. Rivera et al., 2018). Lo anterior se puede corroborar según lo expuesto en el trabajo de investigación realizado por Marín et al., (2018) donde la muestra de suelo a evaluar presento inicialmente una textura franco-arenosa arcillosa con un

54% de arena, un 23% de arcilla y un 23% de limo, de igual forma, se determinó un pH fuertemente ácido y, un contenido de materia orgánica alto.

Un ejemplo de un suelo afectado con hidrocarburos en el Municipio de Toledo, Norte de Santander se puede evidenciar en la figura 3.



Figura 3. Derrame De Hidrocarburos En Suelos De Toledo, Norte De Santander

Nota. Fuente Propia

Además, cuando los suelos son contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos, se evidencian algunas propiedades como un pH de 5.12, un contenido de carbono orgánico de 28.6 g/Kg, una capacidad de intercambio catiónico de 22.3 cmol©/Kg y una conductividad eléctrica de 0.61 dS/m. Así mismo, se observa una cantidad de fósforo extractable de 10.2 mg/Kg con 2.62 mg/g de nitrógeno total y, en cuanto a la textura del suelo se muestra un contenido de 57.6% de arena, 23,2% de limo y, un 19.2% de arcilla (Torri et al., 2018). Según la información recolectada en el artículo de investigación realizado por Torri et al., (2018), la muestra de suelo que se empleó para disipación comparativa de antraceno y fenantreno evidenció como características iniciales un

contenido de 19.2%, 23,2% y 57,6% de arcilla, limo y arena, respectivamente; también se observó un pH de 5.12 con un contenido de carbono orgánico de 28.6 g/Kg. Así mismo, se presentó una capacidad de retención de agua de 19.3%, un 2.62 mg/g de Nitrógeno total, una conductividad eléctrica de 0,61 dS/m, con una capacidad de intercambio catiónico de 22.3 cmol (c)/Kg. Estos suelos con presencia de fenantreno y antraceno se distinguen por presentar algunas propiedades iniciales, tales como textura franco-limosa y un pH de 6,76; además de un contenido total de nitrógeno de 2,66 g N kg⁻¹ y, un 21,8 g C kg⁻¹ de carbono orgánico total (Pérez et al., 2020).

La aplicación de la técnica de enriquecimiento para el aislamiento de bacterias de suelos contaminados con petróleo, permite el crecimiento de varias cepas bacterianas con la capacidad de degradar hidrocarburos y producir biosurfactantes (Liporace et al., 2019). Así mismo, varios autores evidenciaron la reducción de la tensión superficial del medio en más de un 30% en muestras cultivadas en MSM y suplementadas con el hidrocarburo (Liporace, 2018). En cuanto a la técnica por dilución, los autores Moreno & Abasolo, (2019) observaron que hay mayor número de cepas aisladas, si se utiliza como muestra un suelo contaminado por petróleo en comparación con un suelo no contaminado. No obstante, en el análisis realizado sobre las diferentes metodologías para el aislamiento de microorganismos en suelos contaminados con hidrocarburos, se observó que en todas las investigaciones se obtuvieron diversas cepas con potencial biosurfactante, sin importar la técnica utilizada. Aun así, la mayoría de los autores optaron por la técnica de enriquecimiento donde se aplicaba como fuente de carbono el petróleo crudo extraído de la zona de muestreo o un hidrocarburo de tipo comercial donde se destacan el diésel, kerosene y glicerol; además, el medio de cultivo más empleado como base para realizar el aislamiento entre las dos técnicas es el Medio Mínimo Salino, seguido por el medio Luria Bertani.

En cuanto a las características morfológicas y fisiológicas, las colonias bacterianas suelen presentar diversos tamaños, formas y colores en muestras aisladas de suelo contaminado con hidrocarburos (Hanano et al., 2017); el autor Quispe, (2019) observo colonias con una coloración blanca, amarilla y negra, observar figura 4.

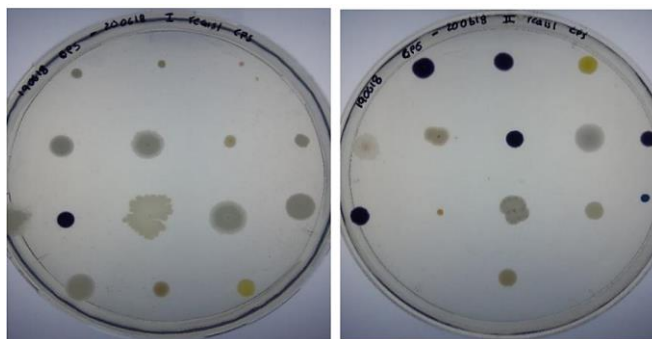


Figura 4. Caracterización macroscópica del crecimiento de colonias en agar petróleo

Nota. Fuente: (Moreno & Abasolo, 2019).

Así mismo, microscópicamente se observa una prevalencia de bacterias Gram negativos (Aguilar, 2013). Según una investigación realizada por Becerra & Horna, (2016) obtuvieron 160 cultivos, de los cuales, según las características morfológicas halladas, el 67,5% de cultivos fueron Gram negativos y el 32,5% fueron Gram positivos. Además, en suelos volcánicos se ha reportado la predominancia de bacterias Gram negativas como productoras de biosurfactantes en un 57,4% (Asalde & Enríque, 2016). El alto porcentaje de bacterias Gram negativas presentes en suelos contaminados con hidrocarburos, puede deberse a la presencia de respuestas a estrés (Morante, 2018), como la formación de conglomerados microbianos en una matriz de exopolisacáridos, también conocido como biofilms, al implementar sus fimbrias de tipo I, IV y flagelos, que conceden a la bacteria la capacidad de alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas (Lasa et al., 2005) Igualmente, pueden implementar diversos mecanismos de resistencia a nivel de envoltura celular como la presencia de porinas en la membrana externa que

facilitan el transporte de sustancias hidrofílicas, la impermeabilidad de sus membranas para regular el ingreso de compuestos hacia el interior y exterior celular y, la diseminación de genes que expresan resistencia a compuestos tóxicos (Troncoso et al., 2017).

Además, la presencia de su membrana celular esta provista de una membrana interna y una externa que limita y separa al citoplasma del periplasma, lo que contribuye a la supervivencia de la población microbiana en ambientes extremos (Ramírez et al., 2001). En cuanto al bajo porcentaje de bacterias Gram positivos, diversos estudios reportan a *Bacillus sp.* como uno de los principales microorganismos que tienen la capacidad de degradar hidrocarburos, evidenciando una tinción Gram positiva, sin producción de Urea ni H₂S e indol negativo. De igual modo, presentan movilidad y fermentación de glucosa, con resultados de catalasa positivos, pero oxidasa negativos (Aquino, 2020).

En las investigaciones consultadas se obtuvieron bacilos cortos y largos con presencia de las enzimas catalasa y oxidasa (Briseño, 2018; Molina, 2020), con crecimiento positivo en agar MacConkey, sin producción de Indol, pero sí de Urea, capaces de hidrolizar la L-arginina y movilidad positiva (Mondragón, 2011). Además, presentan crecimiento en agar Citrato Simons (Ccanche, 2018) y tanto reducción de nitrato a nitrito como de nitrato a nitrógeno, es decir, desnitrificación positiva, evidenciando la producción de las enzimas lisina descarboxilasa y desaminasa (Hernández, 2018).

En términos generales, las bacterias aisladas de suelos con presencia de hidrocarburos suelen presentar una caracterización bajo el microscopio de bacilos largos y cortos (observar figura 5), con una coloración rojiza indicando que son bacterias Gram negativas. Algunas cepas no presentan fermentación de carbohidratos, lo que se puede ver reflejado al realizar la lectura de la prueba TSI con resultados K/N, así mismo, pueden realizar la descarboxilación de lisina, presentar

un óptimo crecimiento en medio Citrato de Simmons, motilidad y ausencia de indol. Además, no generan producción de H₂S, ya que, no se evidencia la formación de precipitado negro de sulfuro ferroso; presentan resultados positivos en las pruebas catalasa y oxidasa, observándose la producción de la enzima catalasa y citocromo-oxidasa, respectivamente. Todo lo anterior se muestra detenidamente en la Tabla 2.

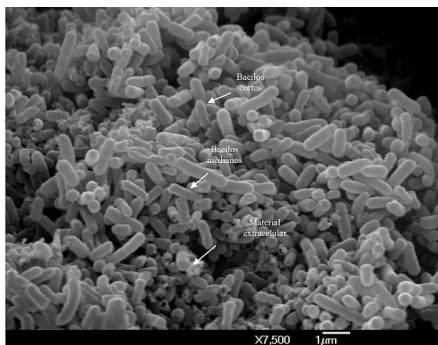


Figura 5. Caracterización Microscopía de Aislados Bacterianos en Suelos Contaminados Con Hidrocarburos.

Nota. Fuente: (Mondragón, 2011).

Tabla 16. Resultados Preliminares para la Identificación de Bacterias con Capacidad de Tolerar Hidrocarburos

Pruebas Bioquímicas	Resultados
Medio TSI	K/N o K/K
Medio LIA	K/K
Catalasa	+
Oxidasa	+
Indol	-
Producción de H ₂ S	-
Agar Citrato de Simmons	+
Tinción de Gram	Gram (-)

Morfología	Bacilos cortos, medianos o largos
Urea	+
Hidrolisis de esculina	-
Hidrolisis de gelatina	+

Nota. Fuente propia

5. Bacterias Hidrocarbonoclastas: Actividad Biosurfactante, Protocolos en la Caracterización Molecular y Secuenciación.

5.1. Técnicas Aplicadas en la Identificación de la Actividad Biosurfactante

Las bacterias hidrocarbonoclastas pueden tolerar y sobrevivir en áreas contaminadas con hidrocarburos al emplearlos como fuente de carbono y nitrógeno; para ello, emplean diferentes mecanismos de adaptación como la producción de moléculas anfifílicas denominadas biosurfactantes.

Los biosurfactantes producidos por bacterias, levaduras y hongos, presentan una región hidrofóbica y una región hidrofílica, encargadas de reducir la tensión superficial aumentando la solubilidad del contaminante y caracterizándose por presentar una concentración micelar crítica baja. Además, funcionan como emulsificantes aumentando la solubilidad de los hidrocarburos, lo cual les facilita a las células microbianas su degradación (Becerra & Horna, 2016; Benavides & Castillo, 2017; C. Rodríguez et al., 2012). Así mismo, poseen menor toxicidad y mayor biodegradabilidad frente a los surfactantes de origen químico y se pueden producir a partir de materias primas renovables; es por ello que en zonas contaminadas con hidrocarburos derivados del petróleo juegan un papel importante al reducir la tensión superficial entre el agua y el aceite; sin embargo, producirlos resulta económicamente costoso, ya que se requieren microorganismos especializados (Benavides & Castillo, 2017; Bohórquez & Castiblanco, 2021).

La identificación de la actividad biosurfactante por diversas cepas bacterianas se puede realizar al emplear diferentes métodos, los cuales se mencionan a continuación.

5.1.1. Pruebas Cualitativas

5.1.1.1. Actividad Hemolítica. Las bacterias productoras de biosurfactantes presentan la capacidad de lisar los glóbulos rojos al producir una hemólisis en placas de agar sangre (Hanano et al., 2017) que conduce a la reducción de la tensión superficial y el rompimiento de la membrana de los hematíes (Becerra & Horna, 2016).

En el laboratorio, esta capacidad hemolítica se puede evidenciar cuando en placas de agar sangre sembradas con cepas microbianas se producen zonas translúcidas o halos verdes en torno a las colonias (observar Figura 6). No obstante, esta prueba no es del todo confiable para el aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes, ya que, existen bacterias capaces de producir enzimas líticas que generan halos alrededor de las colonias (Barrionuevo, 2017; Sarti, 2019).

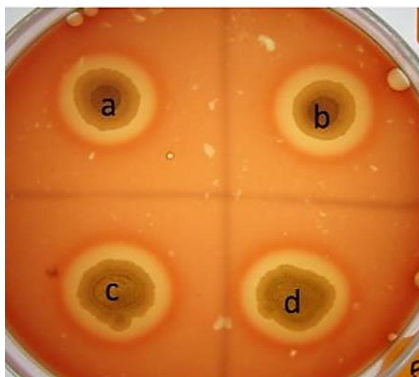


Figura 6. Crecimiento de los Microorganismos en Cepas de Agar Sangre en la Prueba de Actividad Hemolítica

Nota. Fuente: (Becerra & Horna, 2016).

En la realización de esta prueba se suelen inocular las colonias microbianas por punción en placas de Agar sangre, incubándose en un rango de temperatura de 30°C a 37°C durante 48 a 72 horas (Becerra & Horna, 2016; Santos, 2017).

Los resultados positivos en esta prueba se caracterizan por presentar zonas o halos a los alrededores de las colonias microbianas (Pacwa et al., 2014). Así mismo, en la Tabla 3 se puede evidenciar los criterios utilizados por Santos, (2017) en la selección de cepas con actividad hemolítica positiva.

Tabla 17. Criterios Para el Reporte de Resultados en la Prueba de Actividad Hemolítica

Reporte Según Diámetro de la Colonia	
(-)	no presenta hemólisis
(+)	hemólisis completa con un halo de diámetro <1 cm
(++)	hemólisis completa con un halo de diámetro >1 cm, pero < 3 cm
(+++)	hemólisis completa con halo de diámetro \geq 3 cm
Reporte Según el Comportamiento del Halo	
α -hemólisis	Colonia rodeada por un halo verde
β -hemólisis	Colonia rodeada por un halo traslúcido
γ -hemólisis	No se presenta ningún halo

Nota. Fuente: (Santos, 2017).

5.1.1.2. Técnica de Siegmund y Wagner. La naturaleza iónica y catiónica de un biosurfactante se puede determinar mediante la técnica de Siegmund y Wagner (Santos, 2017). Para llevar a cabo esta prueba, se utiliza el agar Siegmund y Wagner que contiene una base mínima de sales, bromuro de cetiltrimetil-amonio (CETAB) y azul de metileno, suplementado con 20 g de glucosa; para llevar a cabo esta técnica, las cepas bacterianas se inoculan mediante punción y luego son incubadas de 30°C a 37°C durante 48 horas (Becerra & Horna, 2016).

Para una mejor visualización de los halos en el medio de cultivo, se recomienda almacenar los medios durante 24 horas a 4°C posterior al tiempo de incubación, ello permitirá oscurecer los

halos para así identificar las cepas que produzcan biosurfactantes en bajas concentraciones (Santos, 2017).

Los resultados positivos en esta prueba se detectan al encontrar un halo azul oscuro alrededor de las colonias (observar figura 7) ocasionado por la formación del par iónico insoluble entre el biosurfactante y el complejo CTAB-azul de metileno (Pacwa et al., 2014).

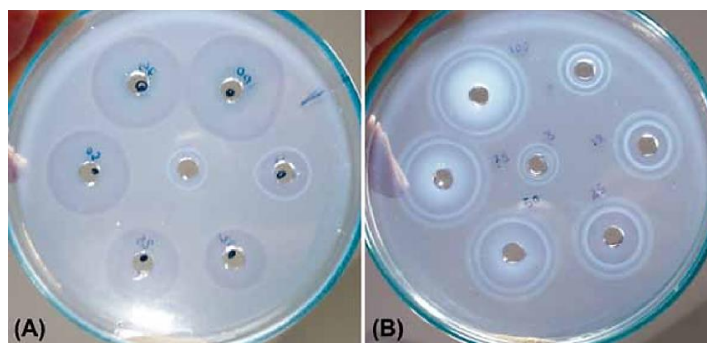


Figura 7. Crecimiento de los Microorganismos en Cepas de Agar Siegmund y Wagner

Fuente: (Tabuchi et al., 2015).

5.1.1.3. Producción de Espuma. Los biosurfactantes presentan características como mayor capacidad de formación de espuma, tolerar temperaturas extremas, biodegradabilidad y menor toxicidad, convirtiéndose en una alternativa frente al uso de tensoactivos sintéticos (Landa, 2021).

Por ende, las cepas bacterianas que producen biosurfactantes tienden a producir o generar agentes espumosos durante su incubación en los diferentes medios de cultivo seleccionados para su crecimiento (observar figura 8) (Santos, 2017).



Figura 8. Producción de Espuma Durante la Incubación de los Medios de Cultivo

Fuente: (Cháves et al., 2016).

5.1.1.4. Producción de Lipasa. La capacidad de producción de enzimas lipolíticas por las bacterias hidrocarbonoclastas se evalúa al sembrar por agotamiento una colonia bacteriana en agar Tween 80, agar Lecitina o agar Rodamina, incubándose a 37°C durante 48 a 72 horas. Como resultado positivo se detecta la formación de un halo opaco alrededor de la colonia (observar figura 9), debido a la liberación de ácidos grasos que conforman los triglicéridos de la membrana celular (Aguilar, 2013; Becerra & Horna, 2016; Santos, 2017).

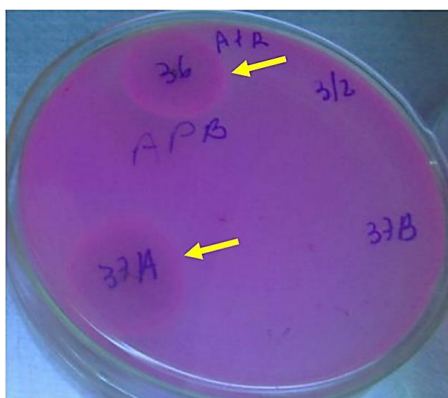


Figura 9. Actividad Lipolítica en Agar Rodamina.

Nota. La Flecha Amarilla Señala Un Halo Fluorescente Anaranjado Alrededor De La Colonia Bacteriana Que Produce Lipasa. Fuente: (Ladrón de Guevara & Serrat, 2018).

5.1.1.5. Dispersión de aceite (OSM). El método de dispersión de aceite se puede llevar a cabo en placas con agar MSM o en 50mL de agua destilada donde se agregan 100ml del hidrocarburo. Posteriormente, sobre la superficie de este, se siembra el cultivo en un solo punto al adicionarle 10ml del filtrado bacteriano, incubándose a 30°C durante 48 horas (Hanano et al., 2017; Parthipan et al., 2017).

Una respuesta positiva se detecta al evidenciar una zona o halo claro sobre la capa del hidrocarburo, capaz de mantenerse por más de un minuto (observar figura 10) (Pacwa et al., 2014; Santos, 2017) .

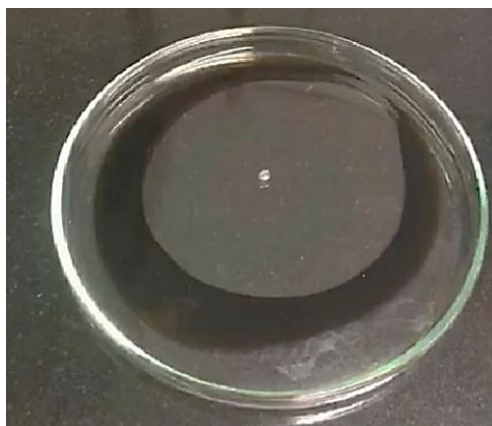


Figura 10. Resultados Positivos al Emplear el Método de Dispersión de Aceite

Fuente: (Ardila, 2019).

5.1.1.6. Prueba con Para Film-M. Para la prueba de la gota colapsada se inocula la cepa bacteriana en 50 mL de caldo soya tripticaseína y se incuba a 37 °C con 150 rpm durante 48 h. Posterior a ello, se toma una alícuota de 10 a 20 µL del sobrenadante bacteriano y se le agregan 5 µL de azul de metileno; una gota de esta mezcla se agrega en papel Parafilm y se observa la forma de esta para realizar el reporte de resultados. Si la gota conserva su forma, la prueba es negativa, mientras que, si la gota toma una forma plana o colapsa, se considera

positivo (observar figura 11) (Santos, 2017). Como control positivo, se puede utilizar una solución saturada de dodecil sulfato de sodio en medio de soya (Lara et al., 2017).



Figura 11. Resultados Prueba de la Gota Colapsada

Nota. a) resultado negativo; b) resultado positivo. Fuente: (Shokouhfard et al., 2015).

5.1.2. Pruebas Cuantitativas

5.1.2.1. Actividad Emulsificante. Un criterio para seleccionar bacterias productoras de biosurfactante es la habilidad de mantener al menos el 50% del volumen de emulsión original 24 horas después de formarse. Además, la calidad y cantidad que presenta una cepa bacteriana en producir un biosurfactante, se puede medir al evaluar el índice de emulsificación (E_{24}) (Ardila, 2019); para ello, es recomendable adicionar entre 2ml- 4ml del hidrocarburo en la misma cantidad seleccionada del caldo que contiene el sobrenadante libre de células (CFS) preparado previamente mediante centrifugación en caldo nutriente (NB) (Ali Khan et al., 2017), se aplica alta velocidad durante 2 min en vórtex y se deja reposar (Becerra & Horna, 2016; Pacwa et al., 2014; Parthipan et al., 2017). Posteriormente, se deben tomar medidas de la altura de la capa emulsionada (cm) y la altura total de la solución (cm) cada 24, 48, 72 y 96 horas. Una respuesta positiva a esta prueba se evidencia al observar formación de espuma entre la fase orgánica

(hidrocarburo) y la fase acuosa (sobrenadante) como se observa en la figura 12, la formula a emplear y, el montaje de la prueba se puede observar en la figura 13; los resultados se pueden clasificar de acuerdo con lo establecido por Santos, (2017) en el trabajo de investigación realizado (observar Tabla 4).



Figura 12. Prueba de Emulsificación de Aceite Mineral en Agua, Realizada por el Biosurfactante Producido por *Pseudomonas Fluorescens* 039t.

Nota. Se observa “-C” que indica control negativo (agua), “C+” que hace referencia al control positivo (Tween 20®, 200 mg·mL⁻¹) y, “T039” que señala la emulsificación producida por el biosurfactante. Fuente: (Rivera et al., 2010).

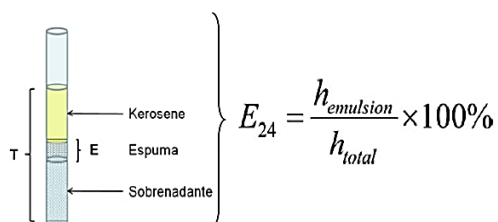


Figura 13. Prueba de Actividad Emulsificante y Fórmula Empleada

Nota. $h_{emulsion}$ es la altura de la capa emulsionada y h_{total} es la altura total de la solución. Fuente: (Santos, 2017).

Tabla 18. Reporte de Resultados en la Prueba de Actividad Emulsificante

(-)	No productora de espuma
(+)	Formación de emulsión, índice de $\geq 40\%$ a las 48 horas
(++)	Formación de emulsión, índice de $\geq 40\%$ a las 72 horas
(+++)	Formación de emulsión, índice de $\geq 40\%$ a las 96 horas.

Nota. Fuente: (Santos, 2017).

5.1.2.2. Tensión Superficial. Los tensoactivos son moléculas que presentan la capacidad de modificar la tensión superficial entre dos líquidos, debido a la monocapa del material tensoactivo situada en la interfase (Menderos & Velasco, 2018).

La medición de la tensión superficial se puede realizar al utilizar un tensiómetro o al implementar el método de ascensión por capilar (Becerra & Horna, 2016), en el que se toman 18ml del sobrenadante libre de células y se lleva a incubación durante 6 a 10 días, calculando la media y el desvío estándar (STD) con ayuda de algún programa de análisis estadístico (Durán, 2019).

Los sobrenadantes se preparan a partir de cepas bacterianas enriquecidas con 20ml de caldo Bushnell-Haas o Medio Mínimo Salino (MSM) suplementado con el hidrocarburo al 1% p/v durante 7 días a 30 ± 2 ° C (Ali Khan et al., 2017). Por último, se seleccionan las cepas bacterianas como productoras eficientes de moléculas biosurfactantes cuando logran reducir la tensión superficial del medio de cultivo a valores inferiores de 35 mN m^{-1} (Patowary et al., 2017).

5.2. Evaluación de la Capacidad de Biodegradación del Hidrocarburo

La contaminación de ecosistemas terrestres, acuáticos y aéreos ha generado una gran problemática ambiental en los últimos años. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son los principales contaminantes del suelo y sedimentos marinos, provocando efectos mutagénicos y cancerígenos en los seres humanos debido a las diferentes vías de ingestión (Shukla et al., 2014). La extracción de hidrocarburos del suelo con diferentes disolventes, se considera adecuada para evaluar la biodisponibilidad de los contaminantes presentes en la zona afectada. El predecir la fracción biodisponible o bioaccesible de los contaminantes en los suelos, es útil para suponer límites de exposición reales en la evaluación de riesgos, mejorando la eficacia de los microorganismos en la biodegradación de hidrocarburos. La biodisponibilidad está determinada por las propiedades fisicoquímicas del compuesto, principalmente por su solubilidad en líquidos, o su capacidad para adsorberse en sustancias sólidas o para volatilizarse (Ramadass et al., 2018).

5.2.1. Determinación de Hidrocarburos Totales

Para la determinación de los hidrocarburos totales se pueden utilizar dos principales métodos, como la extracción de hidrocarburos líquido- líquido y el método gravimétrico.

La extracción de hidrocarburos líquido- líquido se realiza al medio de cultivo tanto al inicio como a los 10 días después de incubado. Para ello se toman 5 mL del sobrenadante obtenido y se añaden 5 mL de diclorometano; la fase orgánica se puede calcular mediante un cromatógrafo GC-2010 Plus. Así mismo, el porcentaje de degradación de hidrocarburos totales (HT) obtenido en cada cultivo, se puede establecer con el área total de todos los picos, mediante la curva de

calibración estándar del hidrocarburo diluido en diclorometano en un rango de 1 a 40 g/L HC, todo ello con la ayuda de un análisis estadístico implementando el software GC-Solution (Liporace, 2018).

En el caso del método gravimétrico, la extracción de hidrocarburo se realiza con la ayuda del diclorometano como disolvente y del medio usado en una relación 1:1, al transcurrir 30 días de incubación; el disolvente se incorpora al caldo de cultivo en agitación y se transfiere a un embudo de decantación. Seguidamente, se lleva a cabo una cuantificación mediante la técnica gravimétrica donde el hidrocarburo remanente es pesado y agregado en un vial de rosca pre-pesado hasta obtener un peso constante, dando como respuesta la biodegradación; el porcentaje de hidrocarburo degradado se puede obtener aplicando el método estándar (Ali Khan et al., 2017).

5.2.2. Biodisponibilidad del Hidrocarburo

En la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, la baja biodisponibilidad de los contaminantes para los microorganismos que pueden degradarlos es un factor importante que limita su biodegradación. El efecto de los surfactantes en la biodisponibilidad de los hidrocarburos se puede describir en dos procesos principales, el primero es la mejora de la desorción de ellos en el suelo para que los microorganismos los puedan utilizar directamente; y la segunda es la interacción del contaminante y la superficie de las células microbianas, permitiendo la incorporación de los nutrientes del suelo en los microorganismos. Cabe resaltar que, una de las metodologías más usadas para determinar la biodisponibilidad de los hidrocarburos es mediante la medición de la densidad bacteriana a lo largo de la biodegradación de hidrocarburos; para ello se usa un espectrofotómetro con una longitud de onda de 600 nm y se cuantifica las Unidades

Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) de cada cepa utilizada en los tratamientos de biodegradación de hidrocarburos, este procedimiento se realiza varias veces durante la biorremediación (Cabana, 2018).

5.2.3. Degradación del Hidrocarburo

La biodegradación de los hidrocarburos por las cepas bacterianas se puede determinar al agregar una concentración del 2% de hidrocarburo en Medio Mínimo Salino (MSM) o en caldo nutritivo con 10% de inóculo microbiano, incubándose a 30°C en condiciones estáticas durante 24 horas. Posteriormente, se realizan tres lavados con solución salina al 0.9% para obtener las suspensiones microbianas, centrifugándose a 6000 rpm durante 5 min a 4°C. Así mismo, se ajusta la densidad óptica del cultivo con el fin de llevarlo al espectrofotómetro a 600 nm. Por último, se toma 1 ml del inóculo y se agrega en 50 ml de MSM o caldo nutritivo, ambos suplementados con 2% de hidrocarburo, incubándose durante 30 a 60 días en condiciones estáticas manteniendo una temperatura de 30°C (Ali Khan et al., 2017; Ordoñez et al., 2018).

Si se desea trabajar con volúmenes pequeños, se pueden tomar 3 ml de la solución bacteriana añadiendo 150 µl del hidrocarburo, dando una agitación constante por una hora para obtener la formación de la fase acuosa (material biológico) y la fase orgánica (hidrocarburo). Luego, se recupera el material biológico con una micropipeta y se determina la densidad óptica, con el fin de estimar la hidrofobicidad de las células, implementando la ecuación 2 (Santos, 2017).

$$H = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) * 100\% \quad (2)$$

En la ecuación 2, H representa el cálculo del porcentaje de bacterias que absorbieron el hidrocarburo, A_0 es la lectura obtenida antes de la agitación con el hidrocarburo y A es la lectura obtenida tras la agitación con el hidrocarburo; así mismo, la Tabla 5 permite evidenciar la clasificación de los resultados al utilizar este método (Santos, 2017).

Tabla 19. Reporte de Resultados para la Adsorción de Hidrocarburos por las Células Bacterianas

(-)	0-39% porcentaje de adsorción de las células
(+)	40-59% porcentaje de adsorción de las células
(++)	60-89% porcentaje de adsorción de las células
(+++)	>90% porcentaje de adsorción de las células

Nota. Fuente: (Santos, 2017).

5.3. Caracterización molecular y secuenciación de cepas bacterianas con actividad biosurfactante.

5.3.1. *Protocolos de Extracción, Cebadores Empleados, Ciclo de PCR y Secuenciación del ADN para la Identificación de Bacterias Hidrocarbonoclastas*

Tabla 20. Métodos de Extracción del ADN y Cebadores Empleados en la Identificación de Bacterias Hidrocarbonoclastas

	Autores	
Extracción de ADN	Kit ultra clean microbial DNA isolation (MOBIO LAB)	(Ordoñez et al., 2018)
	Método CTAB 2X	(Castillo et al., 2020)
	Kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega®)	(Liporace et al., 2019; Liporace, 2018; Mondragón, 2011)
Cebadores	ITS 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3', e ITS4 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'	(Ordoñez et al., 2018)
	27F Forward AGAGTTTGATCMTGGCTCAG y 1492R Reverse TACGGYTACCTTGTTACGACTT	(Castillo et al., 2020; Hanano et al., 2017; Liporace et al., 2019; Liporace, 2018)
	27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1392R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3')	(Hermoza et al., 2019)

E9F (5'-3')	(Mondragón, 2011)
8 F (5 'AGTTTGATCATCGCTCAG 3') y 1492R (5 'GGTTACCTTGTTACGACTT 3')	(Pacwa et al., 2014)
968F (AACGCGAAGAACCTTAC) y 1541R (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA)	(Patowary et al., 2017)
E517F 5'-GCCAGCAGCCGCGTAA-3' y E1065R 5'-ACAGCCATGCAGCACCT-3'	(Briseño, 2018)

Nota. Fuente propia

Tabla 21. Protocolos Empleados para la Amplificación y Secuenciación del ADN de Bacterias con Actividad Biosurfactante

Condiciones de la PCR		Secuenciación	Autores
Coctel de Preparación	Ciclos		
❖ Buffer (1X)	➤ 94°C por 5 minutos.	<i>Macrogen (EEUU)</i>	(Ordoñez et al., 2018)
❖ MgCl ₂ (1.75 mM)	➤ 35 ciclos con etapas de	❖ Chromas LITE	
❖ DNTp's (20mM)	desnaturalización a 94°C durante 1	versión 2.1	
❖ Cebadores (0.4 mM cada uno).	minuto	❖ Base de datos del Gen Bank	
	➤ Hibridación a 54°C por 45 segundos	❖ Bioedit Sequence Alignment Editor	

	➤ Extensión a 72°C durante 40 segundos.	❖ Clasificación filogenética con MEGA versión 6.0	
	➤ PCR con una fase de extensión a 72° C de 1 minuto.		
➤ 2,5µL de ADN molde de 100ng	➤ 1 ciclo de 3 minutos a 94°C y 30 minutos a 94°C.	Laboratorio Divisional de Biología molecular de la División de Ciencias Biológicas de la UAM	(Mondragón, 2011)
➤ 2,5µL del cebador 1µM con 20µM Stock	➤ 30 ciclos de 30 minutos a 55°C y 90 minutos a 72°C.	unidad Iztapalapa	
➤ 1µL de Dntp 200 µM con 10µM Stock	➤ 1 ciclo de 3 minutos a 72°C.	Servidor BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica	
➤ 5µL de Amortiguador 1X con 10X Stock			
➤ 2,5 µL de MgCl ₂ 2,5 µM con 50 µM Stock			
➤ 2,5 µL de enzima 2,5 µM con 50 U/µL Stock y, 0,5 µL de H ₂ Od.			
➤ 5µl de una solución buffer	➤ 94°C por 2 minutos	Unidad de Genómica del Servicio de Secuenciación	(Liporace et al., 2019)
➤ 15 mM de MgCl ₂			

➤ 5µl de solución 1mM de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP)	30 ciclos de:	del INTA Castelar, Buenos Aires
➤ 0,5µl de solución 30 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA)	➤ 94°C por 1 minuto	
➤ 0,3µl de polimerasa Taq (5U/µl)	➤ 55°C por 1 minuto.	
➤ Agua desionizada	➤ 72°C por 2 minutos	
	➤ 72°C por 10 minutos	
	➤ 10°C en el paso final	
➤ 1 µl de la plantilla de ADN	➤ 94 ° C durante 5 min	➤ Servidor BLAST del (Pacwa et al.,
➤ 0,2 µM de cada cebador.	➤ 3 ciclos a 94 ° C durante 45	Centro Nacional de 2014)
➤ Tampón de reacción 10 × (Fermentas)	s, 57 ° C durante 30 s, 72 ° C durante 120 s.	Información Biotecnológica.
➤ 1,5 mM de MgCl ₂ (Fermentas)	➤ 3 ciclos a 94 ° C durante 45	➤ Analizador genético AbiPrism®3100.
➤ 200 µM de dNTP y 1 U de DreamTaq ADN polimerasa (Fermentas)	s, 56 ° C durante 30 s, 72 ° C durante 120 s	➤ Kit de secuenciación de ciclo Big Dye® Terminator (Applied Biosystem).
	➤ 3 ciclos a 94 ° C durante 45	
	s, 55 ° C durante 30 s, 72 ° C durante 120 s.	

	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 26 ciclos a 94 ° C durante 45 s, 53 ° C durante 30 s, 72 ° C durante 120 s; ➤ Ciclo de alargamiento final a 72 ° C durante 5 min. 		
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tampón estándar 1X ➤ 1,5 m mol l⁻¹ MgCl₂ ➤ 0,2 μ mol l⁻¹ cada cebador ➤ 0,2 m mol l⁻¹ dNTP ➤ 0,25 U Taq ADN polimerasa (Sigma Aldrich, EE.UU.) ➤ 25 ng de ADN molde 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Desnaturalización inicial a 94 ° C durante 5 min. ➤ 35 ciclos de desnaturalización a 94 ° C durante 30 s. ➤ Hibridación a 60 ° C durante 30 s, ➤ Extensión a 72 ° C durante 45 s. ➤ Extensión final a 72 ° C durante 7 min. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Servidor BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica. ➤ ClustaIW ➤ MEGA 6 	(Patowary et al., 2017)
<ul style="list-style-type: none"> ➤ 10 μL de muestra de DNA 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Desnaturalización a 94°C durante 5 min, amplificación. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Macrogen (Seúl, Corea del Sur) 	(Briseño, 2018)

<ul style="list-style-type: none"> ➤ 5 µL de primer (concentración de 5 pmol) 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 33 ciclos a 94°C durante 45seg, 55°C durante 45seg, 72°C durante 45seg). ➤ Extensión final a 72°C durante 8min 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Servidor BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ 5µl de una solución buffer ➤ 15mM de MgCl₂ ➤ 5µl de solución 1mM de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP) ➤ 0,5µl de solución 30mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) ➤ 0,3µl de polimerasa Taq (5U/µl) ➤ Agua desionizada 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 94°C por 2 minutos ➤ 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos, 72°C por 10 minutos y 10°C en el paso final. 	<ul style="list-style-type: none"> Unidad de Genómica del Servicio de Secuenciación del INTA Castelar (Liporace, 2018) ➤ Software BioEdit® bases de datos EZ Taxon, RDP y SILVA
	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Sistema Vega IIXMU (TESCAN, checo) 	<ul style="list-style-type: none"> (Hanano et al., 2017)

Método de Sanger (Castillo et al., 2020; Hermoza et al., 2019)

- Programa DNA Dragon
- Software bioinformático Qiime2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology II).

Nota. Fuente propia

5.3.2. Identificación Molecular de Enzimas Implicadas en la Actividad Biosurfactante

5.3.2.1. Síntesis de Ramnolípidos. Los genes que codifican enzimas implicadas en la síntesis de ramnolípidos pueden ser identificados al utilizar los cebadores rhlABF 5' CAG GCC GAT GAA GGG AAATA 3' y rhlABR 5' AGG ACG ACG AGG TGG AAA TC 3' dirigidos al tamaño del fragmento 777 pb, los cuales tienen la capacidad de detectar la síntesis potencial de ramnolípidos por el P-1 presión. Para ello, la PCR debe contar con una mezcla de 1 µl de plantilla de ADN, 0,2 µM de cada cebador, tampón de reacción 10 × (Fermentas), 1,5 mM de MgCl₂ (Fermentas), 200 µM de dNTP y 1 U de Taq ADN polimerasa (Fermentas) en un termociclador C1000 Touch™ (BioRad); manejando condiciones de 95 ° C durante 5 min, y 30 ciclos de 30s a 95 ° C, seguido de hibridación por 1 min a 50 ° C, un paso de extensión de 2 min a 72 ° C y, un paso de extensión final durante 10 min a 72°C; se tiene en cuenta una mezcla de reacción de control sin ADN añadido (Pacwa et al., 2014).

5.3.2.2. Síntesis de Glicolípidos. Para identificar la enzima que tiene la capacidad de catalizar la biosíntesis de glicolípidos, conocida como diacilglicerol glucosiltransferasa (b-DGS), se diseñan los cebadores específicos b-DGSF y b-DGSR, que permiten amplificar la longitud completa de ORF del gen b-DGS utilizando <http://www.lbioinformatics/c3gimer.primer3plus.cgi>. Luego, se inicia con la extracción de ADN genómico bacteriano, el cual se puede usar como plantilla para el proceso de amplificación; la PCR se realiza en gel de agarosa al 1,5%, después se corta, se extrae y purifica con el kit de purificación QIAquickPCR (Qiagen, Alemania) (Hanano et al., 2017).

5.3.2.3. Biodegradación de Hidrocarburos. También es importante detectar las enzimas que codifican genes implicados en la degradación de hidrocarburos, mediante los cebadores alkBfd 5' AAC TAC MTC GAR CAY TAC GG 3' y alkBRd 5' TGA MGA TGT GGT YRC TGT TCC 3' (donde M = AC, R = AG e Y = CT) y nahAc-7F 5' ACT TGG TTC CGG AGT TGA TG 3' y nahAc-7R 5' CAG GTC AGC ATG CTG TTG TT 3' dirigidos a fragmentos de 100 y 136 pb, con la finalidad de identificar las enzimas alcano monooxigenasa y naftaleno dioxigenasa. En la PCR se prepara la mezcla con 1 µl de la plantilla de ADN, 0,2 µM de cada cebador, tampón de reacción 10 × (Fermentas), 1,5 mM de MgCl₂ (Fermentas), 200 µM de dNTP y 1 U de DreamTaq ADN polimerasa (Fermentas) en un termociclador C1000 Touch TM (BioRad); teniendo en cuenta que la amplificación por PCR se lleva a cabo a 95 ° C por 5 min, y 35 ciclos de 1 min a 94 ° C seguidos de hibridación por 30s a 49 ° C y un paso de extensión de 45s a 72 ° C para el gen alkB y 37 ciclos de 20s a 94 ° C seguido de hibridación durante 15s a 56 ° C y un paso de extensión de 15s a 72 ° C para el gen nahAc y, luego un paso de extensión final de 5 min a 72 ° C. En esta amplificación se da la presencia de un control positivo que contiene ADN aislado de la cepa que permite degradar hidrocarburos aromáticos para el gen nahAc y, un control mezcla que no contiene ADN añadido para ambos genes (Pacwa et al., 2014).

5.4. Identificación de Aislados Bacterianos con Producción de Moléculas Biosurfactantes.

Los microorganismos (bacterias, hongos y algas) capaces de transformar parcial o totalmente los hidrocarburos para utilizarlos como fuente de carbono y energía reciben el nombre de microorganismos hidrocarbonoclastas (BHC); por ende, se consideran indispensables en ecosistemas contaminados con petróleo, ya que, pueden degradar hidrocarburos policíclicos

aromáticos, los cuales son altamente tóxicos (Esquivel et al., 2018). Son considerados microorganismos cosmopolitas, al encontrarse en aire, suelo y agua (Bravo, 2018); se caracterizan por su capacidad de utilizar un amplio rango de hidrocarburos como fuente de carbono y energía, producir biosurfactantes, reducir la tensión superficial, poseer alta hidrofobicidad y habilidad para expresar genes catalíticos a través de vías aeróbicas y anaeróbicas (Cevallos & García, 2018; Esquivel et al., 2018). Los biosurfactantes producidos por estos microorganismos, son moléculas anfifílicas con una región hidrofóbica y una región hidrofílica, encargadas de reducir la tensión superficial aumentando la solubilidad del contaminante. Además, funcionan como emulsificantes aumentando la solubilidad de los hidrocarburos, lo cual les facilita a las células microbianas su degradación (Becerra & Horna, 2016; Benavides & Castillo, 2017; C. Rodríguez et al., 2012). De forma general, los biosurfactantes presentan diversas propiedades, como las observadas en la Tabla 8.

Tabla 22. Propiedades de las Moléculas Biosurfactantes

Características	Propiedades de interés
Los niveles de concentración micelar crítica (CMC) son relativamente bajos.	Puede disminuir las tensiones superficiales e interfaciales.
Su actividad superficial es alta.	Presenta bajos niveles de humectación y penetración.
Presenta una adsorción gradual y actividad continua.	Su crecimiento microbiano mejora.
Presentan baja toxicidad y formación de espumas.	Realizan acciones como la hidrofilidad e hidrofobicidad.
Son biodegradables y biocompatibles.	Pueden secuestrar metales y realizar acción antimicrobiana.

Nota. Fuente propia

La actividad biosurfactante de bacterias hidrocarbonoclastas extraídas de suelos contaminados con hidrocarburos, puede detectarse mediante pruebas cualitativas y cuantitativas. En las primeras se destaca la siembra en agar Siegmund y Wagner donde se produce un halo azul y, la actividad hemolítica en agar sangre donde se forma un halo transparente o verdoso (Vásquez et al., 2018). Así mismo, las principales pruebas cuantitativas engloban la actividad emulsificante y la evaluación de la tensión superficial.

Según Cháves et al., (2016) los biosurfactantes pueden causar hemólisis en agar sangre, dispersar el aceite, formar espuma y disminuir la tensión superficial, corroborándose al realizar un estudio en donde las cepas bacterianas aisladas de suelos fueron capaces de elaborar espuma durante la incubación, producir hemólisis, dispersar el aceite y emulsificar petróleo, diésel y gasolina. Así mismo, se ha encontrado que las cepas *Thalassospira sp.*, y *Bacillus sp.*, presentan la capacidad de producir β -hemólisis y α -hemólisis en agar sangre, mientras que, *Enterobacter sp.*, puede producir halos en agar CTAB indicativo para la prueba de agar azul o Siegmund y Wagner (Durán, 2019). Por otro lado, en una investigación realizada por Mora et al., (2005) se identificó la producción de β -hemólisis en las cepas *P. aeruginosa* BIOMI E3 y *P. aeruginosa* BIOMI E5, así como, una emulsión del 50% y 83,13% respectivamente; en cuanto a la tensión superficial, la cepa BIOMI E3 obtuvo 28,51 dinas/cm y la cepa BIOMI E5 genero 51,03 dinas/cm.

Cabe resaltar que, las cepas bacterianas pueden alcanzar la concentración micelar crítica del biosurfactante entre las primeras 24horas a 48horas, reduciendo la tensión superficial de un $67,33\text{mN/m} \pm 0,13\text{mN/m}$ hasta $26,23\text{mN/m} \pm 0,01 \text{mN/m}$ (Liporace et al., 2019). Igualmente, se han identificado bacilos Gram (+) alargados y delgados, identificados como cepas de *B. licheniformis* LB 05 y *Bacillus sp.* 5P capaces de presentar una actividad máxima hemolítica a las 24 horas de la fermentación, identificando que la producción de esta molécula está directamente

asociada con la cantidad de fuente de carbono presente en el medio. No obstante, resultados positivos o negativos en las pruebas cualitativas, no indican directamente la ausencia de la actividad surfactante; para corroborar los resultados obtenidos, conviene implementar pruebas relacionadas con la naturaleza de la fuente de carbono utilizada para la elaboración de la molécula anfifílica, como la actividad emulsificante (E24) y la tensión superficial, ya que, la bacteria se verá forzada a utilizar el hidrocarburo como fuente de energía y carbono al producir estas moléculas con el fin de crecer en el medio (Camacho, 2018). La figura 14 permite evidenciar los índices de emulsificación (E₂₄) de distintas cepas bacterianas en diferentes tiempos de fermentación.

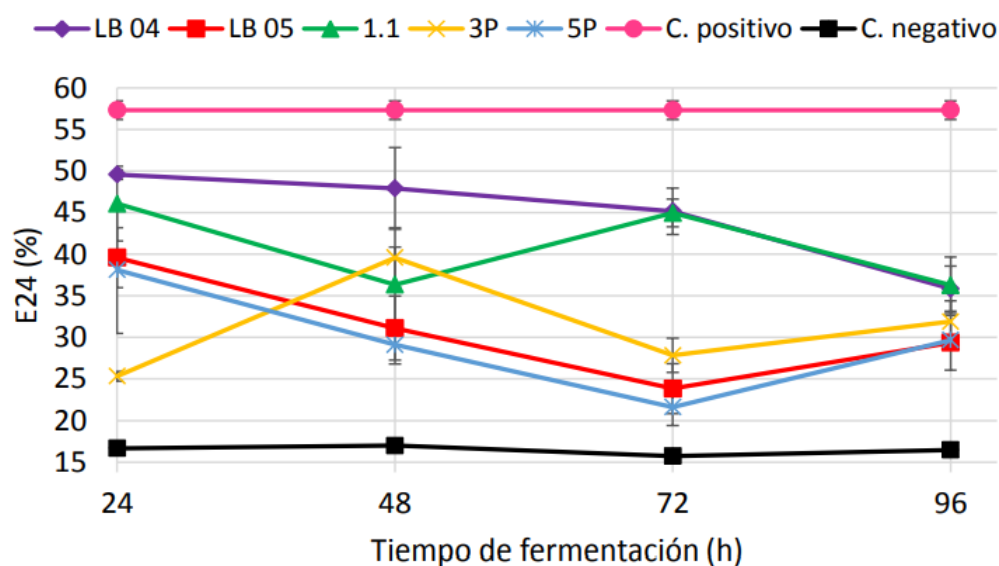


Figura 14. Índices de Emulsificación

Nota. Cepas *B. licheniformis* LB 04, *B. licheniformis* LB 05, Cepa 1.1, Cepa 3P y *Bacillus* sp. 5P. Fuente: (Camacho, 2018).

En cuanto al porcentaje de degradación de hidrocarburos, la cepa *Pseudomonas* MT1A3 obtuvo una disminución del 46.5% luego de 10 días de incubación al implementar la técnica de cromatografía gaseosa, como se observa en la figura 15 (Liporace et al., 2019).

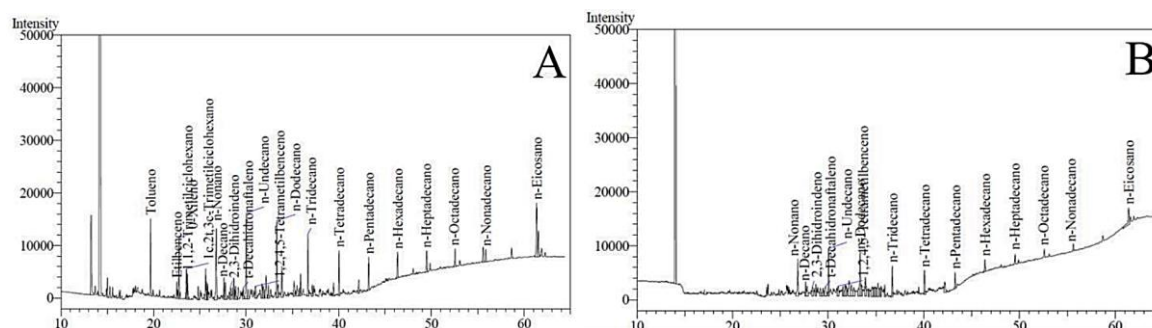


Figura 15. Técnica de Cromatografía Gaseosa para Hidrocarburos Totales

Nota. A) Control al día 0; B) cepa MT1A3 en el día 10. Fuente: (Liporace et al., 2019).

Así mismo, en un estudio llevado a cabo por los autores Ali Khan et al., (2017) se identificó la capacidad biorremediadora de las cepas *Pseudomonas poae* BA1, *Acinetobacter bouvetii* BP18, *Bacillus thuringiensis* BG3 y *Stenotrophomonas rhizophila* BG32, al producir biosurfactantes en concentraciones de hidrocarburos, logrando un porcentaje de biodegradación del 96.07, 93.53, 89.97 y 87.10, respectivamente (observar figura 16).

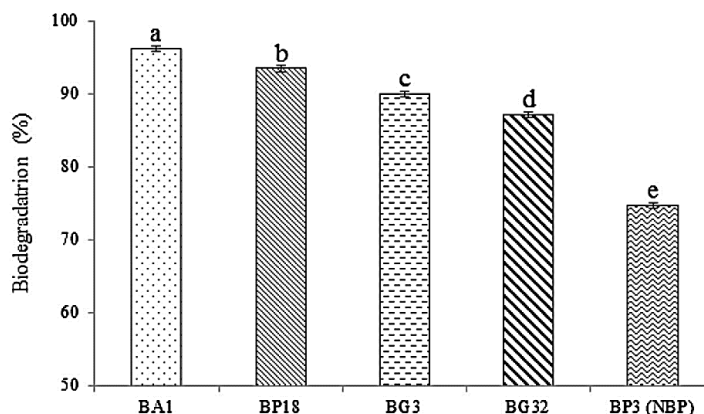


Figura 16. Biodegradación de Hidrocarburos por Diferentes Cepas

Nota. * NBP = no productora de biosurfactantes. Fuente: (Ali Khan et al., 2017).

Por otro lado, en el trabajo realizado por Ordoñez et al., (2018) se determinó la biodegradación de hidrocarburos alifáticos ($C_{10} - C_{16}$) presentes en el queroseno con las cepas *Candida metapsilosis* y *Burkholderia cepacia*, previamente incubadas en medio MSM enriquecido con queroseno en concentraciones de 6%, 10% y 2%,6%, 10% junto con el control abiótico Qs2 con 2% de queroseno; observaron que la biodegradación fue similar en las dos cepas obteniendo una mayor disminución en las áreas relativas de tetradecano, pentadecano y hexadecano, como se registra en la figura 17.

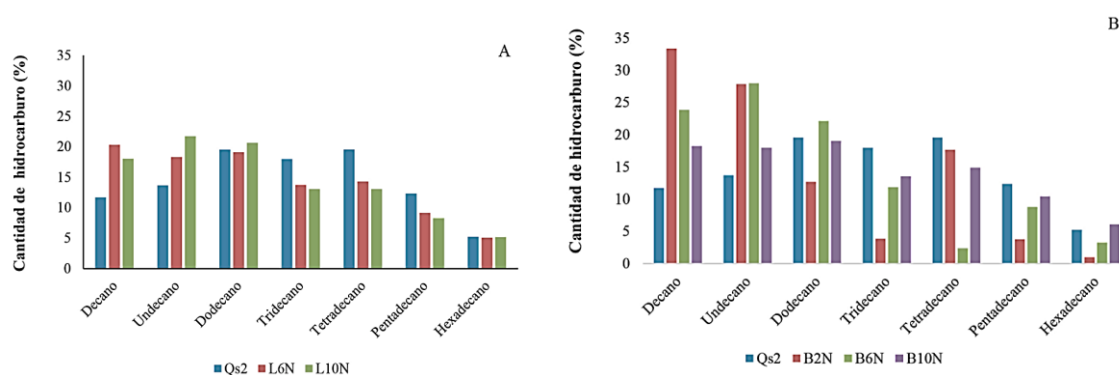


Figura 17. Porcentajes de Degradación de Hidrocarburos.

Nota. A) *Candida metapsilosis*, B) *Burkholderia cepacia*. Fuente: Ordoñez et al., (2018).

También, se puede evidenciar mediante la metagenómica los principales filos bacterianos con potencial biorremediador presentes en suelos y aguas contaminadas con hidrocarburos (observar figura 18). Además, empleando la identificación por caracterización del gen ARNr 16S se puede constatar que las cepas bacterianas aisladas de estos lugares, pertenecen a los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Proteus* y *Morganella* (Castillo et al., 2020).

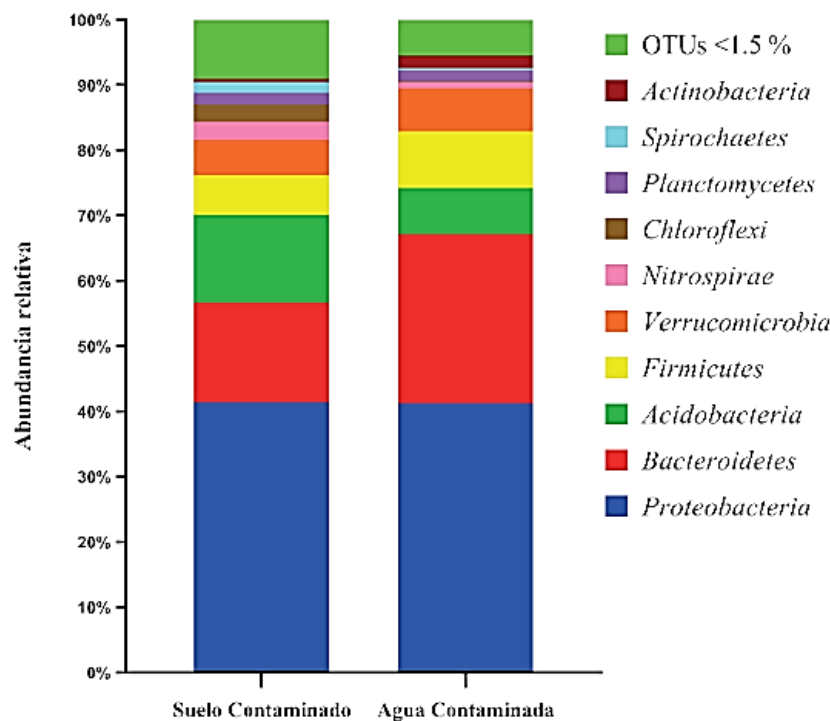


Figura 18. Principales Filos Bacterianos según la Asignación Taxonómica

Nota. Siendo los más representativos *Proteobacteria* (41,5 % en SC y 41,3 % en AC), *Bacteroidetes* (15,3 % en SC y 25,9 % en AC) y *Acidobacteria* (13,4 % en SC y 7,0 % en AC). SC= suelo contaminado; AC= agua contaminada.

Fuente: (Castillo et al., 2020).

Así mismo, mediante secuenciación de ADN se han identificado a las especies *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus amyloliquefaciens*, capaces de disminuir la tensión superficial al utilizar el hidrocarburo como fuente de carbono (Becerra & Horna, 2016). De igual importancia, la bacteria *Thalassospira* sp. presenta actividad biosurfactante, donde al realizar una secuenciación genómica para identificar los genes implicados en la biosíntesis del biosurfactante, se encontró que el gen (ppsD) estaba directamente involucrado en la síntesis de la molécula anfifílica denominada plipastatina clasificándose como un lipopéptido (Durán, 2019). Además, al emplear el kit BBL Crystal™ se identificó la cepa *Burkoldheria*

cepacia SH3 capaz de biorremediar hidrocarburos alifáticos saturados presentes en suelos contaminados con petróleo (Ordoñez et al., 2018).

Por otro lado, mediante la secuenciación del gen 16S rRNA en la base de datos NCBI GenBank, los autores Patowary et al., (2017) identificaron la especie bacteriana *P. aeruginosa* con un 99,90% de similitud, aislada previamente de suelos contaminados con hidrocarburos, donde esta especie bacteriana se considera como productora de biosurfactante.

La figura 19 permite evidenciar la identificación molecular, las secuencias de nucleótidos y la búsqueda BLAST para la cepa bacteriana que presenta un 99% de similitud con la especie bacteriana *Pseudomonas aeruginosa*.

Cepa	Porcentaje de similitud	Género y especie
1A	87 %	<i>Pseudomonas</i> sp
1B	99 %	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1C	98 %	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1D	98 %	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3A	99 %	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3B		Sin identificar
3C	99 %	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HQ712124.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain MYL-21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	
HQ609597.1	<i>Pseudomonas</i> sp. DG1b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	
HQ609593.1	<i>Pseudomonas</i> sp. DG2b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	
HQ674988.1	Bacterium C69(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	
HQ457019.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain R2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	
HQ457018.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain DSE2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	
HQ457014.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain HSD1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	
HQ270549.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain GPSD-59 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	
HQ658761.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain nsm 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	
HQ641259.1	<i>Pseudomonas</i> sp. E6(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	100%	0.0	99%	

Figura 19. Identificación Molecular de una Cepa Productora de Biosurfactantes

Nota. Presenta un 99% de similitud con la especie *Pseudomonas aeruginosa*. Fuente: (Mondragón, 2011).

De la misma forma, mediante pruebas de caracterización molecular se ha identificado a la familia *Micrococcaceae*, específicamente la especie *Kocuria rosea* capaz de crecer en presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos como el naftaleno, así como en el filo de las *Proteobacterias*, la especie *Burkholderia pseudomallei* se caracteriza por metabolizar cadenas carbonadas (Hermoza et al., 2019). De forma similar, una alta velocidad de crecimiento y capacidad tensoactiva en zonas contaminadas con 3 distintos hidrocarburos (nafta super -RON95, diésel <2000ppm de azufre y kerosene) se evidencio en una cepa que al someterse a un análisis del ARNr 16s, se identificó como *Pseudomonas koreensis* capaz de implementar los 3 hidrocarburos como única fuente de carbono (Liporace et al., 2019).

Por otro lado, la capacidad de sintetizar biosurfactantes glicolípidos se identificó en cepas bacterianas al llevar a cabo el análisis filogenético, donde se corroboró que la secuencia de rDNA 16S presentaba una similitud de secuencia del 99% con las cepas *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 y *P. aeruginosa* PAO1 (observar figura 20) (Pacwa et al., 2014).

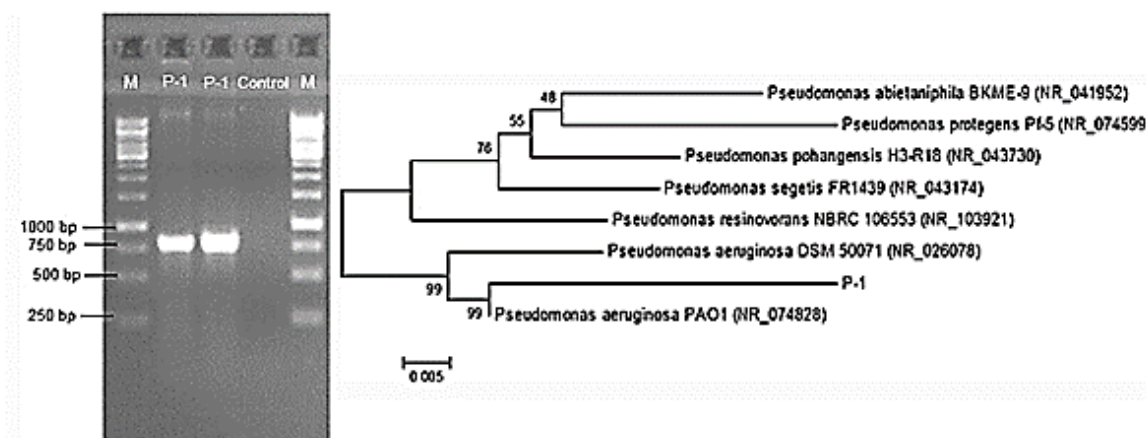


Figura 20. Amplificación del Fragmento de ADN (777 Pb) y Árbol Filogenético de la Cepa P-1

Nota. Identificada *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 y *P. aeruginosa* PAO1. Fuente: (Pacwa et al., 2014).

Así mismo, la cepa *B. safensis* PHA3 presenta gran capacidad para utilizar el Petróleo Crudo, siendo necesario realizar un análisis filogenético que se puede observar en la Figura 21 (Hanano et al., 2017).

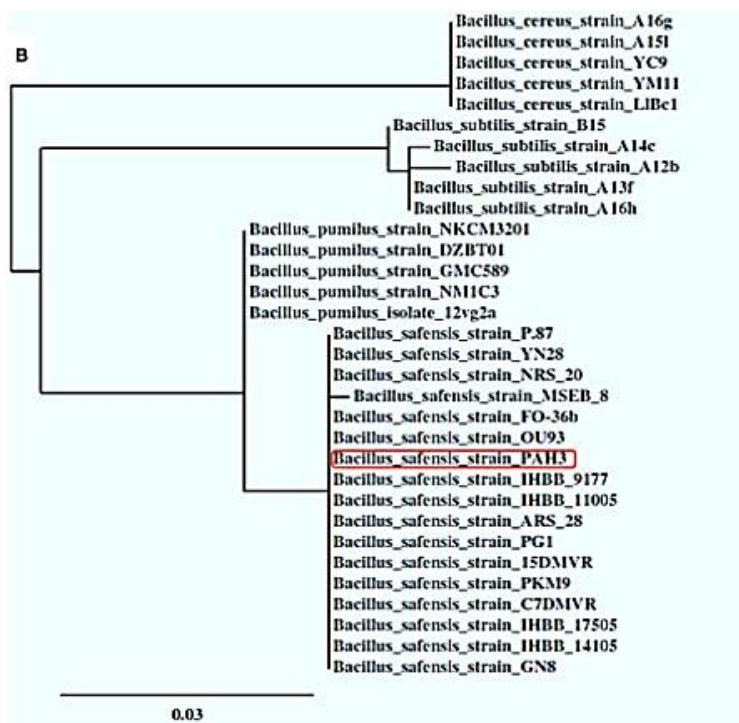


Figura 21. Análisis Filogenético de *B. safensis* PHA3 Basados en las Secuencias de ARNr 16S

Nota. La cepa PHA3 se indica con un rectángulo rojo. Fuente: (Hanano et al., 2017).

Cabe resaltar que en sitios contaminados por petróleo crudo, los géneros bacterianos más representativos son *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas hibscicola*, *Pseudomonas indica*, *Pseudomonas prosekii*, *Pseudomonas tolaasii*, *Bacillus aerius*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus paralicheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter brisouii* y *Acinetobacter oleivorans*, identificados mediante el gen 16S con un producto de 500-600 pb al que se le aplicó PCR (observar figura 22) (Briseño, 2018).

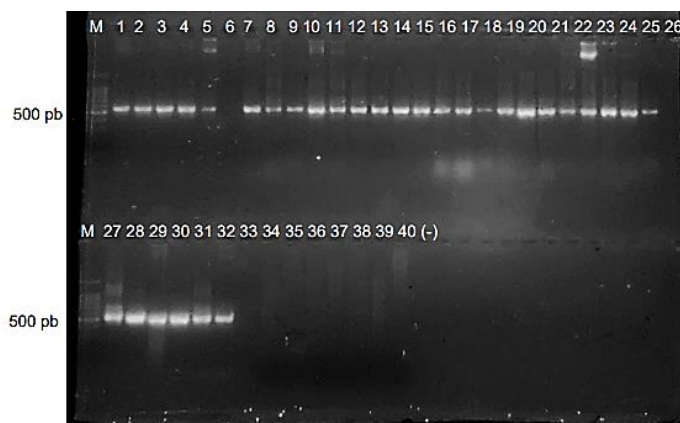


Figura 22. Identificación Molecular de Cepas Bacterianas Mediante el Gen 16S en Suelos Contaminados por Petróleo Crudo

Fuente: (Briseno, 2018).

Por último, Liporace, (2018) a partir de sitios crónicamente contaminados con hidrocarburos, encontró la producción de biosurfactantes en las cepas Ag HC, Mt HC, Lg HC y Tk1 HC CG, relacionadas con el género *Pseudomonas*, y los microorganismos Tk1 HC CC pertenecientes al género *Cellulosimicrobium*. La figura 23 permite evidenciar los resultados arrojados por las bases de datos EZBioCloud y SeqMatch RDP mediante el análisis del ARNr 16s de las cepas bacterianas aisladas.

Muestra	Resultado	Grupo al que pertenecería según Mulet y col. ¹⁴⁴
Ag HC	99,3% identidad respecto de <i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 (T) (AF468452)	<i>P. fluorescens</i>
Mt HC	99,6% de identidad respecto de <i>Pseudomonas kunmingensis</i> (HL22-2(T)) (JQ246444) (EZBioCloud)	<i>P. oleovorans</i> , <i>P. stutzeri</i> o <i>P. aeruginosa</i>
Lg HC	99,86% de identidad respecto de <i>Pseudomonas veronii</i> (CIP 104663 (T)) (AF0644660)	<i>P. fluorescens</i>
Tk 1 HC CG	100% de identidad respecto de <i>Pseudomonas panipatensis</i> (Esp-1(T)) (EF424401)	<i>P. aeruginosa</i>
Tk 1 HC CC	99,7% de identidad respecto de <i>Cellulosimicrobium funkei</i> (ATCC BAA-886 (T)) (AY501364).	No corresponde

Figura 23. Resultados Obtenidos Mediante el Análisis del ARNr 16S de las Cepas Aisladas de Sitios Crónicamente Contaminados con Hidrocarburos.

Fuente: (Liporace, 2018).

6. Aportes y Desafíos de las Bacterias Hidrocarbonoclastas en la Presente Era

Antropogénica

Tan solo en los últimos 50 años la Amazonía ha desaparecido en un 20%. Las actividades antropogénicas han generado un desgaste de los recursos naturales, provocando graves pérdidas en la biodiversidad de países como Argentina, Brasil, Chile y Estados Unidos (Ortega et al., 2019). Como civilización hemos basado nuestro bienestar personal y social en la producción de una gran cantidad de desechos, producto de la sobreexplotación de los recursos naturales; esto ha conllevado a una crisis ambiental que genera un agotamiento y deterioro de los ecosistemas (Tabares & Pareja, 2021). La extracción de hidrocarburos es una de las principales actividades industriales a nivel global, generando un gran impacto en la economía y en diversas actividades del ser humano al contribuir con más del 85% de la energía primaria del mundo. Sin embargo, un derrame accidental origina daños humanos, patrimoniales y ecológicos al afectar la salud pública, terrenos y suelos (Ortiz, 2019).

6.1. Contaminación e Impactos en el Suelo por Derrames de Hidrocarburos

El suelo es un recurso natural encargado de sostener la vida en el planeta (Peña et al., 2019), es un sistema dinámico que se encuentra conformado por materia orgánica, agua, nutrientes y oxígeno, encargados del desarrollo de la vida. Así mismo, sus capas se diferencian, entre sí, por su textura, estructura, color, composición química, mineralógica y biológica (Cevallos & García, 2018). Cuando el suelo se encuentra en condiciones óptimas tiene capacidad de amortiguamiento

al permitir el desarrollo correcto de los ciclos biogeoquímicos, conservando sus propiedades químicas, físicas y biológicas (Peña et al., 2019).

Sin embargo, el normal funcionamiento del ecosistema inmerso en la matriz suelo, está siendo afectado por contaminantes que presentan una tasa de biodegradación natural más lenta; por el contrario, en zonas donde no hay presencia de sustancias peligrosas se puede realizar la mineralización de compuestos biodegradables en condiciones naturales más eficaces (di Salvo & García de Salamone, 2018; Peña et al., 2019; Torri et al., 2018).

El petróleo es la principal fuente energética del mundo, pero en casos de derrames, fugas o una inadecuada extracción y purificación por la industria petrolera se convierte en uno de los mayores contaminantes del planeta, provocando efectos negativos sobre el medio ambiente, lo cual representa un riesgo para la salud pública al expandirse en los suelos, las fuentes hídricas y afectando la productividad agrícola y la biota allí presente (Chiriví et al., 2020; Lugo, 2017; Mendoza, 2018; Velásquez, 2016). Los compuestos hidrocarbonados volátiles tienden a evaporarse rápidamente sin necesidad de aplicar alternativas para su recuperación. Por el contrario, los componentes no volátiles como los HAP permanecen allí por largos periodos de tiempo, provocando daños en los ecosistemas y en la cadena trófica, al ser absorbidos por las raíces de las plantas inhibiendo el crecimiento de las mismas; en el sistema vascular se diseminan, por lo cual logran llegar a la zona más alta de la especie vegetal, causando la expansión del contaminante en la atmósfera (Madigan, 2015; Torri et al., 2018; Ugaz et al., 2020).

En los suelos, los hidrocarburos impiden el ingreso de nutrientes a las especies vegetales al modificar los valores de pH, temperatura, conductividad eléctrica, humedad y, concentración de iones Ca^+ , Mg^+ , K^+ , Na^+ , P , Al^{+++} , NO_3^- y N , afectando el intercambio gaseoso con la atmósfera (Esquivel et al., 2018), además de la disminución de su fertilidad al perder nutrientes

indispensables como el nitrógeno, fósforo, oxígeno y potasio, acidificándolo (pH de 4 a 5) y, causándole la muerte a los microorganismos autóctonos allí presentes (Cevallos & García, 2018); provocando pérdidas en la biodiversidad, cambios en el sustrato original y, enfermedades en la población humana cercana al lugar afectado (Pérez, 2018). El nivel de afectación del suelo puede variar según el grado de toxicidad del hidrocarburo, los derivados del petróleo más peligrosos y altamente resistentes a la degradación son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), siendo altamente ecotóxicos; afectan gravemente la salud de los seres vivos al actuar como disruptores endocrinos, provocando estrés oxidativo en las células, presentando efectos carcinogénicos y mutagénicos (Lugo, 2017; Quijano et al., 2017).

6.2. Perspectiva Nacional e Internacional

El segundo país más biodiverso del mundo es Colombia, identificado con 85 ecosistemas de los cuales 27 han sido deteriorados. El constante crecimiento urbano y poblacional conlleva al uso intensivo de agentes tóxicos que terminan contaminando diversos ambientes, amenazando la capacidad y organización biológica del país. Para el 2030, las tres cuartas partes del consumo energético mundial provendrán de combustibles fósiles, generando una gran huella ecológica a futuro, donde se necesitarán aproximadamente 1,7 planetas Tierra para producir los recursos que requieren los seres humanos a nivel global y satisfacer el modelo consumista (Duque, 2021; Ortega et al., 2019). Cerca de 45 millones de hectáreas de suelo en Colombia se encuentran erosionadas, degradadas y sin porosidad, lo que imposibilita la capacidad del suelo para producir alimentos y retener agua. En pocas palabras, el 70% del territorio nacional presenta erosión donde los

departamentos más afectados son Santander, Magdalena, Huila, Córdoba y La Guajira, generando una inseguridad alimentaria a sus habitantes (Blanco, 2019).

Hoy en día, Colombia es uno de los países con mayor número de conflictos ambientales. Desde 1960, se han registrado más de 2.575 veces la voladura de oleoductos, derramando millones de barriles de crudo en departamentos como Putumayo, Arauca, Nariño y por supuesto, Norte de Santander, llegando a generar riesgos cancerígenos a sus habitantes debido a la exposición de estos en el medio ambiente (Méndez & Zapata, 2021); un derrame de petróleo crudo en el ambiente altera las condiciones fisicoquímicas del suelo, genera una película superficial en cuerpos de agua que impide el ingreso de luz y perturba los procesos de fotosíntesis, lo que conlleva a una afectación de la cadena alimentaria de forma directa, como se observa en la figura 24 (Vera, 2021).



Figura 24. Aguas Contaminadas con Hidrocarburos en el Municipio Toledo, Norte de Santander

Extraído de (el ESPECTADOR, 2019)

En 2015 más de 10.000 barriles de petróleo contaminaron el océano Pacífico debido a un ataque al oleoducto Trasandino en Tumaco (Nariño) por parte del grupo guerrillero de las FARC, ocasionando que 160.000 habitantes se quedaran sin agua. Así mismo, en 2020 un total de 2.442 animales y 6.001 árboles tuvieron contacto directo con hidrocarburos al derramarse un total de 550 barriles de crudo en aguas del río Sogamoso, quebradas La Lizama y caño Muerto (Pardo, 2018).

En los últimos 7 años, los municipios de Nariño y Putumayo se han visto gravemente afectados por la instalación de válvulas ilícitas en el oleoducto transandino, lo que ocasiona rupturas en las tuberías que conllevan a derrames de hidrocarburos (observar Tabla 9) (Guerrero, 2018).

Tabla 23. Derrames de Petróleo y su Nivel de Afectación en los Municipios de Nariño y Putumayo en 2015 a 2019

Año/Mes	Lugar	Magnitud	Afectación a cuerpos de agua y comunidades
2019/03	Vereda San Francisco, en Ricaurte	Ruptura de tubería y derrame de crudo	Caída de crudo en el río Güiza.
2019/01	Vereda Pususquer, en Mallama	Ruptura de tubería y derrame de crudo	Afectaciones a cultivos y contaminación al agua y suelo.
2018/04	San Andrés de Tumaco	Ruptura de tubería y derrame de crudo	Río Caunapí y río Rosario. Veredas la Espriella y Pueblo Nuevo sin agua potable.
2015/06	Kilómetro 72 de la vía Tumaco-Pasto	Derrame de 410 mil galones	Vertimiento de crudo en la Quebrada Pianulpí afectado a los ríos Güiza y Mira que surten a Tumaco (160 mil personas sin agua potable).
2014/07	Valle de Guamuez	Derrame de 235 mil galones de petróleo	Río Cohembí y Guamuez (343 personas sin agua potable).
2018/05	Vereda Casa Fría (Pupiales)	Rotura de la tubería	Cascada Piñuelas
2015/06	La Cabaña en Puerto Asís	130 mil galones	Contaminación de nacederos de agua que surtían la población de las veredas La Cabaña y La Carmelita. Vertimiento de petróleo en lago con

alevinos y peces adultos, de
cachama y mojarra.

Nota. Fuente: (Guerrero, 2021).

En Brasil, el barco petrolero Sinclair derramó aproximadamente 70.000 toneladas de petróleo a las fuentes hídricas; en el Golfo Pérsico se han arrojado cerca de 1,8 millones de toneladas de petróleo crudo en las áreas fronterizas con Kuwait e Irak generando graves perjuicios en la salud. Así mismo, más de 780.000 toneladas de petróleo se han derramado en el Golfo de México, representando un grave desastre petrolero; en el río Coco ubicado en Ecuador se vertieron cerca de 11.400 barriles de petróleo en el año 2013, evidenciado por manchas negras en el recurso hídrico que llegaron a afectar el Parque Nacional Yasuní, considerado como una de las zonas con mayor diversidad biológica del planeta (Martínez, 2020), este hecho impactó también a Perú y el Amazonas. Por último, las rupturas en el oleoducto Norperuano han provocado consecuentes derrames de hidrocarburos en el departamento de Amazonas (observar Tabla 10) (Meléndez, 2021).

Tabla 24. Vertimientos de Hidrocarburos en Distintas Provincias del Departamento de Amazonas

Pertenecientes a Perú en 2011 a 2016

Fecha	Descripción	Provincia - Distrito
03/04/2011	Derrame ocurrido en la estación N°7 progresiva km 513 + 500 – tramo II	Utcubamba – El Milagro
04/09/2012	Derrame ocurrido en el km 397 + 300 – tramo II	Condorcanqui – Nieva

21/09/2013	Derrame ocurrido en el km 504 + 400 – tramo II	Bagua – Bagua
19/02/2015	Progresiva km 504 + 086 tramo II	Bagua – La Peca
06/11/2015	Km 516 +408 tramo II	Utcubamba – El Milagro
25/01/2016	Km 440 + 781 tramo II	Bagua – Imaza

Nota. Fuente: (Meléndez, 2021).

6.3. Aprovechamiento de las Bacterias Hidrocarbonoclastas

Los derrames de hidrocarburos afectan gravemente las condiciones químicas, físicas y biológicas de suelos y aguas subterráneas (Restrepo, 2021); no obstante, en un suelo contaminado con hidrocarburos albergan muchos tipos de microorganismos con capacidad hidrocarbonoclastica, encargados de producir biosurfactantes de baja toxicidad, empleados en biorremediación (Mohanty et al., 2021), técnica ecológica mediante la cual se pueden reducir la concentración total de contaminantes en los ecosistemas mediante la biotransformación, biodegradación y mineralización por parte de organismos vivos, donde las bacterias se destacan en mayor proporción clasificándose como el principal agente degradador (Islas et al., 2015).

Los microorganismos hidrocarbonoclastas (BHC) son aquellos que pueden utilizar como fuente de carbono y energía un amplio rango de hidrocarburos, ya que, tienen la capacidad de producir biosurfactantes y reducir la tensión superficial. Así mismo, están dotados de una alta hidrofobicidad y una habilidad para expresar genes catalíticos a través de vías aeróbicas y anaeróbicas (observar Tabla 11). Cabe resaltar que estos microorganismos son de suma importancia en la industria de petróleo al degradar en suelo, agua y aire, sustancias tóxicas como

los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Esquivel et al., 2018). Por otro lado, parámetros fisicoquímicos como la presencia de nitrógeno, fósforo, contenido de oxígeno, presión parcial de gases, temperatura, pH, contenido de sales, diámetro, distribución de partículas, solubilidad, concentración y, cantidad y biodisponibilidad de los contaminantes; son los que influyen en la tasa de degradación realizada por los microorganismos hidrocarbonoclastas (Cevallos & García, 2018; di Salvo & García de Salamone, 2018). Algunos de los contaminantes que pueden degradar los microorganismos hidrocarbonoclastas son la gasolina, el petróleo, los aceites de motor y, los hidrocarburos; siendo útil en ambientes que se encuentran afectados por derrames de petróleo crudo y sus derivados, mediante la aplicación de técnicas como la biorremediación (Briseño, 2018).

Tabla 25. Aspectos Relevantes que Presentan los Microorganismos Hidrocarbonoclastas

Características	Fuentes de carbono	Autores
✓ Capacidad de producir surfactantes.	✓ Ácidos	(Briseño, 2018;
✓ Genéticamente estables con rápidas tasas de reproducción.	✓ Azúcares	Villalobos & Niño,
✓ Adaptación en el ambiente contaminado en menor tiempo.	✓ Polisacáridos	2020)
✓ Productos metabólicos finales no tóxicos.	✓ Lípidos	
	✓ Proteínas	
	✓ Hidrocarburos alifáticos	
	Fuentes de Nitrógeno	
✓ No ser patógenos.	✓ Amonio	
	✓ Nitratos	
	✓ Aminoácidos	
	✓ Peptonas	
	✓ Proteínas	

Nota. Fuente propia

Las especies bacterianas que son más empleadas como microorganismos hidrocarbonoclastas son *Pseudomonas putida*; *Pseudomonas fluorescens*; *Pseudomonas paucimobilis*; *Pseudomonas mendocina*; *Pseudomonas vesicularis*; *Pseudomonas cepacia*; *Alcaligenes sp.*; *Mycteronas spificans*; *Alcaligenes faecalis*; *Bacillus cereus*; *Vibrio sp.*; *Cyclotrophicus sp.*; *Stenotrophomonas maltophilia*; *Beijerinckia sp.*; *Micrococcus sp.*; *Nocardia sp.* y *Flavobacterium sp* (Shukla et al., 2014).

La producción de biosurfactantes es un mecanismo de respuesta, empleado por este tipo de bacterias, en donde se utilizan como fuente de carbono y energía diversos tipos de hidrocarburos, éstas moléculas biológicas dependen del tipo de microorganismo que pueda producirlas (observar Tabla 12), es por ello que, *Pseudomonas sp.* tiene la capacidad de producir biosurfactantes, ya sean glicolípidos, también llamados trehalolípidos, soforolípidos y ramnolípidos, en el momento en que entra en contacto con el hidrocarburo, facilitando su ingreso a la pared celular en la fase estacionaria para solubilizar dichos compuestos hidrófobos (Pérez et al., 2015).

Tabla 26. Principales Bacterias Productoras de Biosurfactantes

Especie bacteriana	Tipo de Biosurfactante	Autor
<i>Pseudomonas sp</i>	Artrofactina	(Toribio et al., 2014)
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	Biosur - Pm	(Niño, 2020; Raiger & López, 2018)
<i>Pseudomonas corrugate</i>	Corrugatina	(Toribio et al., 2014)
<i>Pseudomonas syringae</i>	Pseudomicina A	(di Giorgio et al., 1997;
MSU 16H		Toribio et al., 2014)

<i>Pseudomonas fluorescens</i> DR54	Viscosina y viscosinamina	(Janek et al., 2020; Toribio et al., 2014)
<i>Pseudomonas putida</i> PCL1445	Putisolvina I y II	(Oni et al., 2020; Toribio et al., 2014)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B301D	Iringomicina y siringopeptina	(Toribio et al., 2014)
<i>Pseudomonas</i> sp DSS73	Amphisina	(Loiseau et al., 2018; Toribio et al., 2014)
<i>Pseudomonas koreensis</i> 2.74	Lokisina	(Toribio et al., 2014)
<i>Pseudomonas entomophila</i>	Entolisina	
<i>Pseudomonas</i> sp WJ6	Surfactina, fenhicina y lichenisnina	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ramnosil- β - hidroxidecanoil- β -hidrodecanoato (monoramnolípido) y el ramnosil-ramnosil- β - hidroxidecanoil- β - hidrodecanoato (diramnolípido).	(Toribio et al., 2014; Vijayakumar & Saravanan, 2015)
<i>Serratia rubidea</i>	Ramnolípido	(Niño, 2020)
<i>Arthrobacter paraffineus</i>	Trehalolípidos	
<i>Lactobacillus fermentii</i>	Diglicosil diglicéridos	

<i>Arthrobacter</i> sp.	Artrofactina	
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lichenisina A, Lichenisina B	(Niño, 2020; Vijayakumar & Saravanan, 2015)
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactina	(Niño, 2020; Vijayakumar & Saravanan, 2015)
<i>Bacillus pumilus</i>	Surfactina	(Niño, 2020)
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Sulfonilípidos	
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Emulsan, Alasan	(Niño, 2020; Raiger & López, 2018)
<i>Bacillus</i> strain	Lipopéptidos	(López et al., 2019)
<i>Acinetobacter</i> spp	Fosfatidiletanolamina	(Vijayakumar & Saravanan, 2015)
<i>Acinetobacter</i> spp. HO1-N	Biosurfactantes particulados	(Vijayakumar & Saravanan, 2015)

Nota. Fuente propia

6.4. Papel de las bacterias hidrocarbonoclastas frente a los agentes contaminantes derivados de la actividad antropogénica

El fenómeno de la contaminación no es un tema aislado, ya que, afecta a países desarrollados y subdesarrollados por igual (observar figura 25). No obstante, está claro que entornos pobres e insalubres generan mayor contaminación, hábitos menos saludables y mayores

enfermedades donde por lo general, los niños y jóvenes son los más vulnerables y afectados. Teniendo en cuenta que para los seres humanos las primeras dos décadas de vida proveen muchos beneficios en la salud y bienestar general para toda la vida, la Organización Mundial de la Salud (OMS) propone la implementación de la salud medioambiental (SMA) para mejorar la calidad de vida al controlar y prevenir factores medioambientales que contribuyen al desarrollo de enfermedades respiratorias o intestinales, las cuales representan el 26% de muertes anuales afectando a 1,5 millones de personas en el mundo, lo anterior se puede evidenciar en la figura 26 (Ortega et al., 2019).

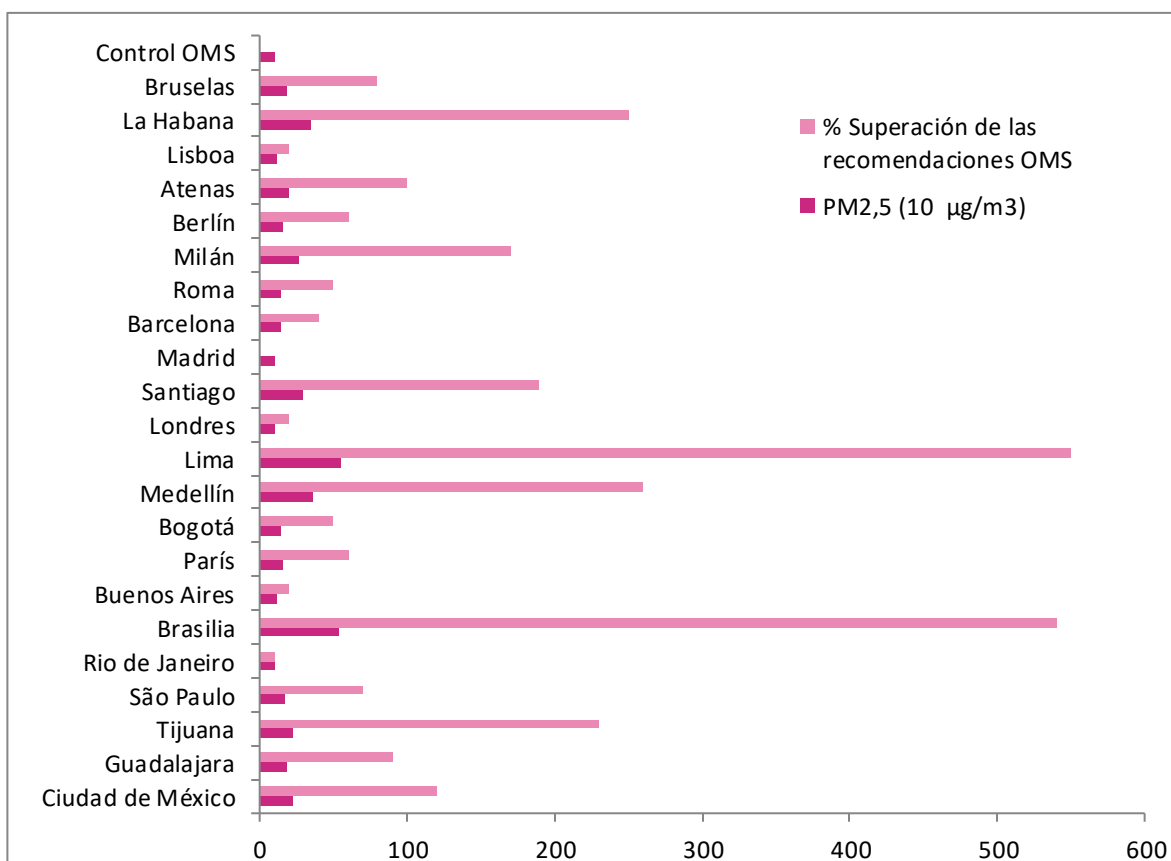


Figura 25. Comparación de la Media Anual de Materia Particulada en Diversos Países

Fuente: (Ortega et al., 2019).



Figura 26. Impacto Del Medio Ambiente En La Salud

Fuente: (OMS, 2020).

Así mismo, los hidrocarburos son compuestos orgánicos tóxicos que se utilizan en distintas actividades industriales para la elaboración de fármacos, herbicidas o insecticidas, considerándose como compuestos de origen antropogénico o xenobióticos tóxicos, caracterizados por provocar impactos negativos a nivel ambiental y en la salud pública (Pérez, 2020). Los derrames de hidrocarburos generan impactos ambientales incalculables; la tragedia del buque petrolero Exxon Valdez en Alaska en 1989 ha sido considerada uno de los mayores

casos de contaminación de petróleo en el mundo al derramar 11 millones de galones al mar, así mismo, en el golfo de México en 2010 se vertieron más de 13 millones de galones en el océano Atlántico. Sin embargo, Colombia ha superado estos incidentes en gran proporción (Guerrero, 2018; Velásquez, 2016), la industria de los hidrocarburos se encuentra expuesta a muchos riesgos y amenazas debido a los diversos desastres ambientales generados por la voladura de los oleoductos por grupos armados al margen de la ley (observar Tabla 13), donde el Oleoducto Caño Limón-Coveñas con una extensión de 773,94 kilómetros, atravesando departamentos como Magdalena, Sucre y Norte de Santander, es uno de los más afectados desde los años 80, llegando a contaminar cerca de 40.500 metros lineales de cuerpos de agua y 65.000 metros cuadrados de suelos con hidrocarburos (observar Tabla 14). En el periodo 2000-2016 se presentaron 179 conflictos sociales en Colombia donde el 87,2% era debido a la extracción de petróleo, carbón y oro, influenciados por la presencia de grupos marginales en las reservas del país (Guerrero, 2018).

Tabla 27. Derrames de Hidrocarburos Generados en los Últimos Años Debido a Atentados Terroristas

Fecha o Año	Barriles Derramados	Sector
14 julio 1986	45.743	La Donjuana, Municipio del Carmen de Tonchala Norte de Santander.
Febrero 1988	93.952	Llego al lago Maracaibo Venezuela.
15 mayo de 1990	14.000	Zapatoza Cesar.
Julio 1992	45.000	San Roque, en los ríos Ité y Cimitarra.
2005	22.458	Ciénagas de Juan Manuel, Aguas Blancas y Aguas Negras, en el estado Zulia, Venezuela.
25 de marzo de 2014	-	La China, municipio de Toledo, Norte en Santander.

Abril de 2019	-	Río Tibucito y Pozo Azul, un sitio turístico de Norte de Santander.
---------------	---	---

Nota. Fuente: (Vera, 2021).

Tabla 28. Fallas en el Oleoducto Caño Limón-Coveñas a su Paso por Norte de Santander Durante el Segundo Semestre de 2018

Fecha	Tamo afectado del OCLC	Causa	Tipo de aceptación
4 de diciembre	Vereda Cedeño, municipio de Toledo	Voladura	60 metros de tubería del OCLC, caída del fluido en la capa vegetal, cierre temporal de tramo de 900 metros de la vía la soberanía.
14 de noviembre	Vereda Quebrada seca (Cúcuta)	Voladura	Propagación de gases, derrame de hidrocarburo extendido en un área de 80 metros cuadrados de capa vegetal. Incendio en un bosque.
10 de noviembre	Vereda Cedeño, municipio de Toledo	Voladura	Caída de petróleo en capa vegetal y en la vía la Soberanía.
21 de septiembre	Municipio de Toledo	Fenómeno de remoción en masa causado por la fuerte ola invernal	Derrame de crudo en capa vegetal y afluentes cercanos.
5 de septiembre	Corregimiento Llana Baja- Teorama	Voladura	Derrame del fluido remanente en una quebrada del corregimiento Llana baja.

Nota. Fuente: (M. E. Guerrero, 2018).

Según (Ecopetrol, 2020) en Colombia cada día ocurren al menos 3 instalaciones de válvulas ilícitas por grupos al margen de la ley, ocasionando la pérdida de más de 2.500 barriles diarios de hidrocarburos. En Norte de Santander, los derrames de hidrocarburos han generado diversos problemas ambientales, como los que se evidencian en la Tabla 15.

Tabla 29. Investigaciones Realizadas Sobre las Principales Problemáticas Asociadas a los Hidrocarburos en Norte de Santander

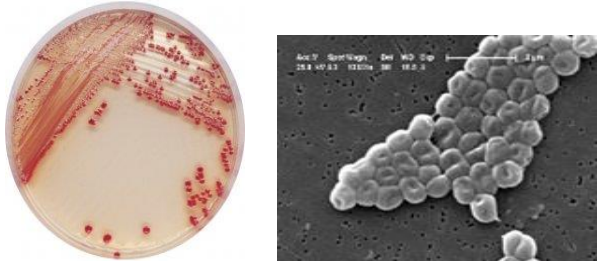
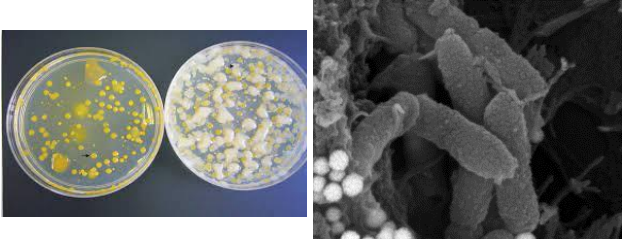
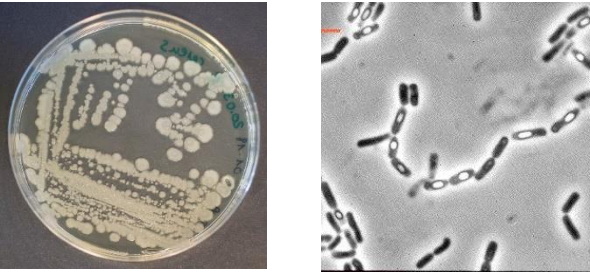
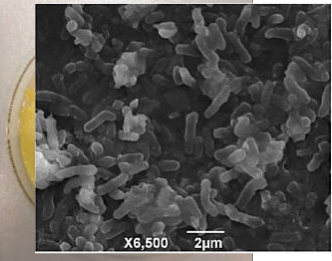
Zona afectada	Problema	Autor
Región Mutiscua ubicada en el departamento de Norte de Santander, con las coordenadas geográficas: longitud Oeste 71° 45' 02", latitud Norte 07° 18' 07". Altitud 2600 m.s.n.m. y temperatura media de 14 °C.	Presencia de Hidrocarburos aromáticos policíclicos en tejidos de Truchas arco iris.	(Quijano et al., 2014)
Río algodonal entre los municipios de Abrego y Ocaña	Derrame de hidrocarburos en el Rio Algodonal.	(Hernández & Ramírez, 2016)
Zona de Catatumbo	Explotación de recursos naturales generando un desgaste de estos.	(Collazos & López, 2018; Vargas & García, 2020)
Toma La Carrillo, Departamento Norte de Santander en Colombia	Elevada demanda de combustibles fósiles.	(Limas, 2018)
Universidad de Pamplona con coordenadas geográficas 7° 54' de latitud norte y 72° 30' al oeste de	Presencia de benzoantraceno, criseno, benzofluoranteno,	(Quijano et al., 2017)

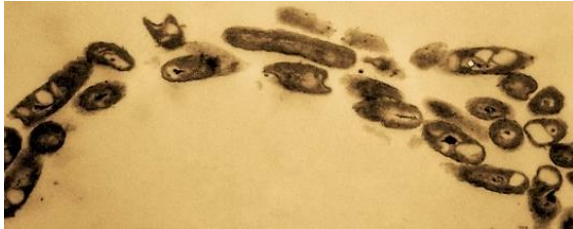
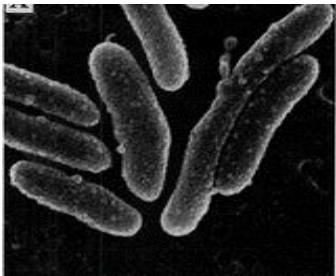
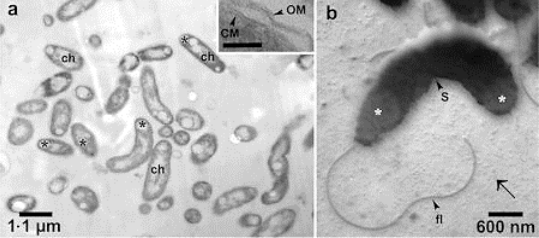
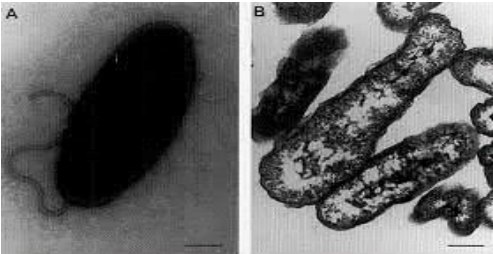
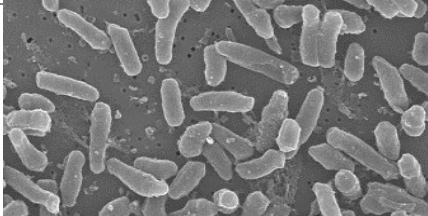
Greenwich, a una altitud de 320 msnm.	benzopireno, indenopireno, dibenzo y antraceno en el aire de Cúcuta.	
Oleoducto Caño limón-Coveñas-Toledo	Derrames de petróleo	(Guerrero, 2018)
Municipio de Ocaña	Fuga de hidrocarburos por un fallo en el transporte.	(Gamboa, 2015)

Nota. Fuente propia: Alvarado, K; Parada, C & Sepúlveda, N, (2020)

No obstante, la actividad microbiológica se encuentra altamente relacionada con la capacidad que presenta un suelo para resistir y recuperarse frente a situaciones de estrés y contaminación (Corrales, 2018), donde los microorganismos hidrocarbonoclastas se destacan por su capacidad para producir biosurfactantes como respuesta medioambiental al estar inmersos en áreas contaminadas con hidrocarburos. Entre los géneros bacterianos mayormente identificados en diversas investigaciones nacionales e internacionales se destacan: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Thalassolituus*, *Cycloclasticus* y, *Mycobacterium* observados en la Tabla 16 (Briseño, 2018; Cabrejos & Sipión, 2019; Ccance, 2018; Ugaz, 2020; Villalobos & Niño, 2020).

Tabla 30. Principales Géneros Bacterianos Encontrados en Áreas Contaminadas con Hidrocarburos

Género Bacteriano	Imágenes Descriptivas	Fuente
<i>Acinetobacter</i>		(LaboratoriosFr anja, 2017; Wikimedia, 2017)
<i>Pseudomonas</i>		(CNB, 2021; Stefanova et al., 2009)
<i>Bacillus</i>		(Sanchez, 2018; Wikimedia, 2021)
<i>Arthrobacter</i>		(Nabal et al., 2020; Xu et al., 2017)

<i>Alcanivorax</i>		(Taringa, 2010)
<i>Marinobacter</i>		(Gauthier et al., 1992)
<i>Thalassolituus</i>		(Microbewiki, 2012)
<i>Cycloclasticus</i>		(Dyksterhouse et al., 1995)
<i>Mycobacterium</i>		(Sinc, 2015)

Nota. Fuente propia: Alvarado, K; Parada, C & Sepúlveda, N, (2020)

La actividad biosurfactante presente en la mayoría de los microorganismos hidrocarbonoclastas, los convierte en una estrategia clave para el campo de la biorremediación de

sitios contaminados con hidrocarburos; en Colombia, esta técnica ha sido implementada hace aproximadamente veinte años, en donde las especies microbianas más representativas son *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Bacillus*, y *Chrysobacterium*, encontradas en los Llanos Orientales, la Orinoquia y la costa Atlántica degradando tolueno, xileno, fenol, naftaleno, diésel, gasolina, entre otros (Mesa, Milena, Ortega, & Sandova, 2018). En un estudio realizado en el Caribe Colombiano, se logró identificar cepas de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. presentes en ecosistemas contaminados con petróleo crudo en concentraciones del 1 al 8%, degradando un 92% del hidrocarburo (Hernández, 2018), así mismo, los autores Ordoñez, Abella, Echeverry, Paz & Benítez, (2019), aislaron microorganismos nativos tales como, *C. metapsilosis* SH1 y *B. cepacia* SH3 capaces de tolerar concentraciones de queroseno del 2% al 10%, al emplear el hidrocarburo como única fuente de carbono.

Diferentes estudios demuestran la eficiencia del uso de biosurfactantes en áreas con presencia de hidrocarburos, destacándose un estudio investigativo, realizado por (Ugaz, 2020) donde se recolectaron muestras de hidrocarburos de tres pozos obteniéndose cinco consorcios bacterianos que producían la máxima concentración de biosurfactantes al crecer en 40°C; igualmente, el Instituto Colombiano del Petróleo (ICP), llevo a cabo la producción de un biosurfactante de tipo ramnolípido utilizando la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ICP 70, observando una eficiencia del 76% (Rosero, Dugarte, Lorely, Piedad & Carvajal, 2002).

7. Conclusiones

La contaminación es un fenómeno global que se incrementa con las continuas actividades que el hombre desarrolla a nivel industrial, en las que se generan residuos que son eliminados de forma incorrecta, además, los diversos derrames de petróleo ocasionados por rupturas a distintos oleoductos debido a la extracción ilegal de crudo, afectan los diferentes hábitats naturales llegando a perjudicar la fauna y la flora; sin embargo, los mecanismos de adaptación desarrollados por bacterias hidrocarbonoclastas permiten la asimilación total y biorremediación del contaminante sin que se generen productos secundarios nocivos para el medio ambiente, devolviéndole las propiedades fisicoquímicas del suelo y, asegurando las formas de vida allí presentes.

Cuando el suelo es afectado por un derrame de hidrocarburos se altera toda la biota allí presente, en donde, aquellos microorganismos mejor adaptados suelen sobrevivir al emplear mecanismos de protección y adaptación que les permiten utilizar los agentes contaminantes como fuente de carbono y energía. De tal manera que, para identificar y aislar a estos microorganismos es importante realizar un muestreo y caracterización de la zona afectada que permita dar a conocer la información básica del suelo contaminado, tomando muestras de cada punto seleccionado, llevándolas al laboratorio e implementando diversos medios de cultivo que puedan detectar inicialmente los aislados promisorios.

Para la identificación de las especies bacterianas eficientes en la degradación de hidrocarburos se emplean distintas técnicas que puedan evaluar la actividad biosurfactante de forma cualitativa y cuantitativa, también se pueden implementar metodologías que muestren la caracterización molecular y secuenciación del microorganismo de interés, así como la

identificación de las enzimas implicadas en la síntesis de biosurfactantes y en procesos de biorremediación; determinándose que los géneros bacterianos más representativos son *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp.

Así mismo, se han identificado diversos desastres ambientales a nivel nacional e internacional en suelo y agua debido a los derrames de hidrocarburos, donde las pérdidas de recursos naturales son considerables, ocasionando daños a nivel patrimonial, ecológico y humano, por ello se concluye que las bacterias hidrocarbonoclastas son una alternativa atractiva en procesos como la biorremediación de suelos, produciendo moléculas anfifílicas de forma ambientalmente segura al estar presentes en áreas contaminadas con hidrocarburos, garantizando la conservación de la biodiversidad y aumentando la resiliencia natural de los suelos.

Por último, es recomendable que, diversas instituciones educativas contemplen el conocimiento de los contaminantes medioambientales y su impacto al entorno, generando conciencia social sobre la interrelación salud y medio ambiente; así como, el desarrollar investigación basada en un alto rigor científico que permita entender los procesos geoquímicos que ocurren en el suelo, con el objetivo de desarrollar diversas estrategias y tecnologías orientadas a la biorremediación de sitios contaminados mediante la aplicación de bacterias hidrocarbonoclastas con potencial biosurfactante, logrando su recuperación y restauración.

8. Referencias

- Aguilar, L. D. (2013). "Aislamiento de Microorganismos Productores de Biosurfactantes." *Universidad Nacional de Trujillo*. <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/3136>
- Ali Khan, A. H., Tanveer, S., Alia, S., Anees, M., Sultan, A., Iqbal, M., & Yousaf, S. (2017). Role of nutrients in bacterial biosurfactant production and effect of biosurfactant production on petroleum hydrocarbon biodegradation. *Ecological Engineering*, 104, 158–164. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLENG.2017.04.023>
- Aquino, H. A. (2020). Aislamiento e identificación de microorganismos de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo de la ciudad de Juliaca. *Revista Científica De Investigaciones Ambientales*, 3(2), 46–54. <http://revistas.upsc.edu.pe/journal/index.php/RIAM/article/view/193>
- Ardila, A. (2019). Análisis y evaluación de la producción de biosurfactante por una *Klebsiella pneumoniae* aislada de una trampa de grasas. *Instname:Universidad de Los Andes*. <https://repositorio.uniandes.edu.co/handle/1992/45461>
- Argoti, A. (2019). Identificación de microorganismos de suelo de páramo alto andino potencialmente electrogénicos para producir bioelectricidad. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/13273>
- Asalde, G., & Enríque, K. (2016). Rendimiento de surfactantes producidos por bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo, 2015.
- Barbosa, E. E. (2016). Aislamiento, caracterización y aplicación de consorcios bacterianos hidrocarbonoclastas para la degradación de hidrocarburos totales en suelos contaminados.

- Barrionuevo, M. R. (2017). Producción de biosurfactantes bacterianos para su uso en procesos de biotratamiento de efluentes industriales con contenido en metales. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6463_Barrionuevo
- Becerra, L. K., & Horna, M. V. (2016). Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 23–31. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2016.01.03>
- Benavides, A., & Castillo, M. (2017). Producción microbiana de biosurfactantes en lactosuero por *Pseudomonas aeruginosa*.
- Blanco, O. (2019). Alternativas para la recuperación de suelos contaminados por actividades industriales en Colombia universidad nacional abierta y a distancia programa ingeniería ambiental.
- Bohórquez, A., & Castiblanco, O. (2021). Revisión del uso de biosurfactantes para su implementación en los procesos de recuperación mejorada de petróleo. *INVENTUM*, 16(31), 4–14. <https://doi.org/10.26620/UNIMINUTO.INVENTUM.16.31.2021.4-14>
- Bravo, P. (2018). Bacterias asociadas a muestras de sedimentos y zooplancton en el Golfo de México.
- Briseño, J. M. (2018). Identificación molecular de cepas hidrocarbonoclastas nativas de suelo en sitios contaminados por petróleo crudo en Tabasco y Veracruz, México. <http://200.57.56.70:8080/xmlui/handle/231104/2208>
- Cabana, L. C. (2018). Evaluación de nuevos sistemas anfifílicos con posible aplicación en la remediación de suelos contaminados. <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/15277>

- Cabrejos, D., & Sipión, S. (2019). Efecto de consorcios microbianos aerobios en la biorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz en la provincia de Chiclayo. <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/7946>
- Camacho, M. (2018). Evaluación de *Bacillus* sp. como potencial productor de un exopolímero con actividad surfactante.
- Castillo, R. T., More Francis J., Cornejo La Torre, M., Fernández, J. N., & Mialhe, E. L. (2020). Aislamiento de bacterias con potencial biorremediador y análisis de comunidades bacterianas de zona impactada por derrame de petróleo en Condorcanqui - Amazonas - Perú. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 22(3), 215–225. <https://doi.org/10.18271/RIA.2020.656>
- Catalán, N., Costa, M., Selaive, S., & Contreras, C. (2017). Aislamiento de microorganismos hidrolíticos de polisacáridos algales. *Agro Sur*, 45(3), 21–28. <https://doi.org/10.4206/AGROSUR.2017.V45N3-04>
- Ccance, J. S. (2018). Determinación de bacterias heterótrofas en suelos contaminados con hidrocarburos y su capacidad de tolerar concentraciones crecientes de petróleo in vitro. *Universidad Nacional Del Altiplano*. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/9127>
- Cevallos, T. C., & García, J. D. (2018). Evaluación de la biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa*. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15681>
- Cháves, J. D., Rodríguez, M. Á., Romero, Y., Ayala, A., Ruvalcaba, J. C., & Toribio, J. (2016). *Pantoea agglomerans* productora de biosurfactante aislada de rizosfera de pastos Tanzania y Llanero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(4), 961–968. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S200709342016000400961&lng=es&nrm=iso&tlng=es

- Chiriví, J. S., Fajardo, C. A., Gómez, L. A., & Delgado, S. D. (2020). Revisión y panorama nacional de la biorremediación microbiana. *Libros Universidad Nacional Abierta y a Distancia; Revisión y Panorama Nacional de La Biorremediación Microbiana; 1 - 77*. <http://repository.unad.edu.co/handle/10596/39953>
- CNB. (2021). *CNB - Spanish National Centre for Biotechnology*. <http://www.cnb.csic.es/index.php/en/>
- Collazos, A., & López, M. (2018). El potencial productivo de la zona de reserva campesina del Catatumbo, departamento de Norte de Santander. https://ciencia.lasalle.edu.co/administracion_de_empresas
- Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca –CAR. (2018). Metodologías de toma de muestras para degradación de suelos y envío a laboratorio y/o in situ para diagnóstico rápido. <https://www.car.gov.co/vercontenido/2561>
- Corrales, D. (2018). Control de la contaminación de los suelos: un desafío para la humanidad. *La Calera, 18*(31), 115–118. <https://doi.org/10.5377/CALERA.V18I31.7903>
- di Giorgio, D., Camoni, L., Marchiafava, C., & Ballio, A. (1997). Biological activities of pseudomycin a, a lipodepsinonapeptide from *Pseudomonas syringae* msu 16h. *Phytochemistry, 45*(7), 1385–1391. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00173-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00173-8)
- di Salvo, L., & García de Salamone, I. (2018). Ecología microbiana de la rizósfera de ryegrass utilizado para fitorremediar suelo contaminados con PAHs. In L. Brutti, M. Beltrán, & García de Salamone (Eds.), *Biorremediación de los recursos naturales* (1st ed., pp. 1–492).
- Duque, G. (2021). ¿Colombia sostenible? <http://alejandria-d.unal.edu.co:8888/xmlui/handle/123456789/210>

Durán, A. (2019). Identificación y cuantificación relativa de genes involucrados en la biosíntesis de biosurfactantes en bacterias marinas. <http://riaa.uaem.mx/xmlui/handle/20.500.12055/703>

Dyksterhouse, S. E., Gray, J. P., Herwig, R. P., Lara, J. C., & Staley, J. T. (1995). *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an Aromatic hydrocarbon- degrading bacterium from marine sediments. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1), 116–123. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-1-116>

Ecopetrol. (2020). Ecopetrol alerta por aumento de válvulas ilícitas en sistemas de transporte.

<https://www.ecopetrol.com.co/wps/portal/Home/es/noticias/detalleNoticias!/ut/p/z1/IVJdT8>

IwFP0rvuxx9NLJRN_G-

AhkUYEMsS9Lt5RR0rWjK5v662nUmKEGsU_33pxz2nNuEUFrRCSteU4NV5IK2z8TP7

nHftidXncfYejdwnw0DvH4po8h9NDTOwBOTgCDBR54AJMHjMj_-

W2ly_hnAOS8_OyvC2wCfLffkwCRTEndXgXas0yVzGgikiYrEsFTTfWrA7RKWOWAV

IZnnLaqKwwYWq1UNWdFqpkDX1IuFUwb6tJDwaRRbk1FfRC0crmwJGMLo6msSqUN

s67Jt3evVgOYx73hApb-LIz8HwA_Hlpjo_58EUXdCfQ-

Aec2d0F2uVDpxzcJZOrlc0Q02zDNdOeg7XhrTFndOdZ70zSdXKlcsE6mCgd-

o2xVZcM9RaKyiOP1W7RZTnc9UUfBEfrJ7BQ!/#

El ESPECTADOR. (2019). Alerta en Toledo, Norte de Santander, por derrame de crudo.

<https://www.elespectador.com/economia/alerta-en-toledo-norte-de-santander-por-derrame->

[de-crudo-article-880688/](https://www.elespectador.com/economia/alerta-en-toledo-norte-de-santander-por-derrame-de-crudo-article-880688/)

Erlinton, D., Burbano, O., Echeverry, A., Universidad Del Valle, T., Marcela, L., & Lasprilla, P.

(2018). Biodegradación de hidrocarburos alifáticos saturados por microorganismos aislados

de suelo contaminado con derivados del petróleo. *Revista de Ciencias*, 22(2), 33–44.

<https://doi.org/10.25100/RC.V22I2.7917>

- Esquivel, R., Ferrera, R., & Alarcón, A. (2018). El papel de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en la fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. In L. Brutti, M. Beltrán, & I. García de Salamone (Eds.), *Biorremediación de los recursos naturales* (1st ed., pp. 1–492).
- Fernández, A., García de la Fuente, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.
- García, J., Peñafiel, D., & Rodríguez, R. (2019). Bioremediación de hidrocarburos en aguas residuales con cultivo mixto de microorganismos: caso Lubricadora Puyango. *Enfoque UTE*, *10*(1), 185–196. <https://doi.org/10.29019/ENFOQUEUTE.V10N1.312>
- Gauthier, M. J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P., & Bertrand, J. C. (1992). *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *42*(4), 568–576. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-4-568>
- Gil, A., Perrotta, L., Salinas, E., & Fernández, G. (2021). Guía Teórico-Práctica de Educación para la Salud.
- Guerrero, M. (2021). Equilibrio ambiental, extracción petrolera y riesgo de desastres en el oleoducto transandino colombiano. *IPSA Scientia, Revista Científica Multidisciplinaria*, *6*(3), 86–101. <https://doi.org/10.25214/27114406.1113>
- Guerrero, M. E. (2018). Ruptura de oleoductos por interferencia externa, daño ambiental y sostenibilidad en Colombia. <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/handle/10567/2332>
- Hanano, A., Shaban, M., & Almously, I. (2017a). Biochemical, Molecular, and Transcriptional Highlights of the Biosynthesis of an Effective Biosurfactant Produced by *Bacillus safensis*

- PHA3, a Petroleum-Dwelling Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 0, 77.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00077>
- Hanano, A., Shaban, M., & Almously, I. (2017b). Biochemical, molecular, and transcriptional highlights of the biosynthesis of an effective biosurfactant produced by *Bacillus safensis* PHA3, a petroleum-dwelling bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN), 77.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00077/BIBTEX>
- Hermoza, M. A., Medina, O. C., Manrique, P. L., Barazorda, H. L. B., & Almirón, J. J. (2019). Análisis de la capacidad degradativa de diésel efectuada por microorganismos acidófilos y su aplicación individual y en consorcio en un sistema de biorremediación. *Veritas*, 20(2), 45–50. <https://doi.org/10.35286/VERITAS.V20I2.242>
- Hernández, K., & Ramírez, R. (2016). Evaluación y valoración de la calidad del agua para consumo humano del río algodónal entre los municipios de Abrego y Ocaña, Norte de Santander. <http://repositorio.ufpso.edu.co/jspui/handle/123456789/1604>
- Hernández, L. E. (2018). Aislamiento y caracterización de una bacteria hidrocarbonoclastica de la región de Valparaíso y su aplicación en biorremediación de hidrocarburos. <https://repositorio.usm.cl/handle/11673/43374>
- Islas, A., Vega, L., Aguilar, R., Xoconostle, B., & Rodríguez, R. (2015). Evaluation of hydrocarbons and organochlorine pesticides and their tolerant microorganisms from an agricultural soil to define its bioremediation feasibility. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 50(2), 99–108.
<https://doi.org/10.1080/03601234.2015.975605>
- Janek, T., Mirończuk, A. M., Rymowicz, W., & Dobrowolski, A. (2020). High-yield expression of extracellular lipase from *Yarrowia lipolytica* and its interactions with lipopeptide

- biosurfactants: A biophysical approach. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 689, 108475. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2020.108475>
- Kulkarni, A. G., & Kaliwal, B. (2015). Bioremediation of Methomyl by Soil Isolate - *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bioremediation & Biodegradation* 2015 6:2, 6(2), 1–7. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000281>
- Laboratorios Franja. (2017). CHROMagar™-Acinetobacter. <http://laboratoriosfranja.com/wp-content/uploads/2017/05/CHROMagar%E2%84%A2-Acinetobacter.jpg>
- Ladrón de Guevara, A. A., & Serrat, M. (2018). Aislamiento y selección de hongos lipolíticos de materiales contaminadas con desechos de aceite vegetal. *Revista Cubana de Química*, 30(3), 362–378. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212018000300001&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Landa, A. (2021). Producción y aplicación de un biosurfactante producido por el consorcio microbiano para la biorremediación de suelos agrícolas contaminados con endosulfán. <https://doi.org/10.16/CSS/JQUERY.DATATABLES.MIN.CSS>
- Lara, R. del C., Gómez, L. M., Sandoval, Á. H., Isaac, K., & Ramírez, N. (2017). Búsqueda de capacidad productora de biosurfactantes en actinobacterias haloalcalófilas y haloalcalotolerantes. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(3), 529–539. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.03.15>
- Lasa, I., Pozo, J. L. del, Penadés, J. R., & Leiva, J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 163–175. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=en

- Limas, G. (2018). Estrategias que permitan mitigar las causas y efectos de la contaminación de la toma la Carrillo, del municipio Villa del Rosario del Norte de Santander (Colombia).
- Liporace, F. A. (2018). Aislamiento de Microorganismos a Partir de Sitios Crónicamente Contaminados para la Producción de Biosurfactantes. <http://ria.utn.edu.ar/xmlui/handle/20.500.12272/3717>
- Liporace, F., Molina, D. C., Odobez, N. S., & Quevedo, C. (2019). Aislamiento de microorganismos a partir de áreas crónicamente contaminadas con hidrocarburos cercanas a zonas urbanizadas, para la aplicación de estrategias de biorremediación / Isolation of microorganisms from areas contaminated with hydrocarbons close to urbanized areas, for the application of biorremediation strategies. *Brazilian Journal of Development*, 5(6), 4660–4674. <https://doi.org/10.34117/BJDV5N6-1663>
- Loiseau, C., Portier, E., Corre, M., Schlüsselhuber, M., Depayras, S., Berjeaud, J., & Verdon, J. (2018). Highlighting the Potency of Biosurfactants Produced by *Pseudomonas* Strains as Anti-Legionella Agents. *BioMed Research International*.
- López, A., Martínez, H., Rodríguez, L., Moldes, A. B., & Cruz, J. M. (2019). Isolation and characterization of a microorganism that produces biosurfactants in corn steep water. *CyTA - Journal of Food*, 17(1), 509–516. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1607909>
- Lugo, L. L. (2017). Interpretación conceptual del estado actual de la biorremediación realizada por microorganismos sobre hidrocarburos aromáticos policíclicos derivados del petróleo. <https://ridum.umanizales.edu.co/xmlui/handle/20.500.12746/4085>
- Luján, D. (2019). Uso de *Pseudomonas aeruginosa* en biorremediación. *BioTecnología*, 23(1), 32–42.

- Luna, R., Alejo, F., & Márquez, M. (2017). Aislamiento de microorganismos solubilizadores de fósforo aislados del ANP Cerro del Cubilete, Guanajuato. *Jóvenes En La Ciencia: Jóvenes Investigadores*, Vol. 3(No.1), 281–285. <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/3425>
- Madigan, M. (2015). *Brock. Biología De Los Microorganismos* (Vol. 14). https://www.elsotano.com/libro/brock-biologia-de-los-microorganismos-14-ed_10475367
- Marín, T. D. M., Gota, C. N. G., & Ortiz, T. C. O. (2018). Evaluación del extracto obtenido como lixiviado de fibra de coco *Cocos nucifera* como bioestimulante en la remediación de un suelo contaminado con petróleo. *Enfoque UTE*, 9(4), 180–193. <https://doi.org/10.29019/ENFOQUEUTE.V9N4.303>
- Martínez, R. (2020). Evaluación de la prevención y atención de derrames en proyectos lineales del sector de hidrocarburos: caso oleoductos. <https://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/8050>
- Mayz, J., & Manzi, L. (2017). Bacterias hidrocarburoclásticas del género *Pseudomonas* en la rizosfera de *Samanea saman* (Jacq.) Merr. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 29–37. <https://doi.org/10.15446/REV.COLOMB.BIOTE.V19N1.57408>
- Meléndez, J. L. M. (2021). Caracterización de suelos afectados por hidrocarburos en una zona agrícola del distrito Imaza, región Amazonas. *Revista Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 4(2), 48–56. <http://revistas.untrm.edu.pe/index.php/CNI/article/view/727>
- Menderos, L., & Velasco, E. (2018). Surfactante pulmonar. ¿Qué puede aportar la Física? *Medicina Respiratoria*, 11(1), 45–53.
- Méndez, F., & Zapata, A. M. (2021). Conflicto armado, contaminación y riesgos en salud: Una evaluación de riesgo por tres fuentes de exposición ambiental asociadas al conflicto en Colombia. *Biomédica*, 41(4), 1–40. <https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.5928>

- Mendoza, R. (2018). Biorremediación de suelos contaminados con petróleo. In M. Brutti, M. Beltrán, & I. García de Salamone (Eds.), *Biorremediación de los recursos naturales* (1st ed., pp. 1–492).
- Microbewiki. (2012). *Thalassolituus oleivorans*.
https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Thalassolituus_oleivorans
- Minenergía. (2021). Terminal Coveñas terminal Coveñas tenay oleoducto alto magdalena (OAM) oleoducto de Colombia (ODC) Ocesa Cupiagua Vasconia Ocesa estación de bombeo rubiales cpf cusiana.
- Mohanty, S. S., Koul, Y., Varjani, S., Pandey, A., Ngo, H. H., Chang, J. S., Wong, J. W. C., & Bui, X. T. (2021). A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production. *Microbial Cell Factories* 2021 20:1, 20(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12934-021-01613-3>
- Molina, G. N. (2020). Determinación de las condiciones para producción de mucopolisacáridos por aislados de *Azotobacter* provenientes de suelos arcillosos contaminados con hidrocarburos de la región amazónica.
<http://repositorio.puce.edu.ec:80/xmlui/handle/22000/18037>
- Mondragón, L. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas aerobias autóctonas de yacimientos petroleros productoras de biosurfactantes para su aplicación en técnicas de MEOR.
- Mora, M. S., Bahsas, A., Velásquez, W., & Rojas, J. O. (2005). Caracterización de biosurfactantes producidos por *Pseudomonas fluorescens* aisladas de emulsiones de petróleo pesado. *Ciencia*, 13(2). <https://produccioncientificaluz.org/index.php/ciencia/article/view/9255>

- Morante, L. (2018). Bacterias degradadoras de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con hidrocarburos en el cantón Quevedo, año 2017. <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/5029>
- Moreno, D. C., & Abasolo, F. (2019). Estudio de microorganismos aislados de un suelo contaminado con desechos derivados de la explotación petrolera y de uno no intervenido. <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/10596>
- Nabal, S., García, J. M., Mormeneo, S., & Millán, M. I. (2020). *Arthrobacter creatinolyticus*: An emerging human pathogen causing urinary tract infection. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 38(2), 88–89. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2019.02.003>
- Niño, S. (2020). Bioprospección de microorganismos presentes en hidrocarburos para determinar el potencial productor de biosurfactantes y determinación de equipos principales para su producción. <https://repository.ean.edu.co/handle/10882/9642>
- OMS. (2020). ¿Cuál es el panorama general?
- Oni, F. E., Geudens, N., Onyeka, J. T., Olorunleke, O. F., Salami, A. E., Omoboye, O. O., Arias, A. A., Adiobo, A., de Neve, S., Ongena, M., Martins, J. C., & Höfte, M. (2020). Cyclic lipopeptide-producing *Pseudomonas koreensis* group strains dominate the cocoyam rhizosphere of a *Pythium* root rot suppressive soil contrasting with *P. putida* prominence in conducive soils. *Environmental Microbiology*, 22(12), 5137–5155. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15127>
- Ordoñez, D. E., Abella, C. A., Echeverry, A., Paz, L. M., & Benítez, N. (2018). Biodegradación de hidrocarburos alifáticos saturados por microorganismos aislados de suelo contaminado con derivados del petróleo. *Revista de Ciencias*, 22(2), 33–44. <https://doi.org/10.25100/RC.V22I2.7917>

- Ortega, J. A., Tellerías, L., Ferrís, J., Boldo, E., Campillo, F., van den Hazel, P., Cortes, S., Ramis, R., Gaioli, M., Monroy, R., Farias-Guardia, C., Borrás, M., Yohannessen, K., García-Noriega-Fernández, M., Cárcelos-Álvarez, A., Jaimes-Vega, D. C., Cordero-Rizo, M., López-Hernández, F., & Claudio, L. (2019). Threats, challenges and opportunities for paediatric environmental health in Europe, Latin America and the Caribbean. *Anales de Pediatría (English Edition)*, 90(2), 124.e1-124.e11. <https://doi.org/10.1016/j.anpede.2018.11.008>
- Ortiz, D. (2019). Efectos ambientales de los hidrocarburos. Una revisión. *Repositorio Institucional USC*. <https://repository.usc.edu.co/handle/20.500.12421/4468>
- Pacwa, M., Płaza, G., Poliwoda, A., & Piotrowska, Z. (2014). Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research 2014 21:15*, 21(15), 9385–9395. <https://doi.org/10.1007/S11356-014-2872-1>
- Pardo, T. (2018). Cifras de derrames de crudo en Colombia en los últimos años. *El Tiempo*. <https://www.eltiempo.com/vida/medio-ambiente/cifras-de-derrames-de-crudo-en-colombia-en-los-ultimos-anos-207664>
- Parthipan, P., Preetham, E., Machuca, L. L., Rahman, P. K. S. M., Murugan, K., & Rajasekar, A. (2017). Biosurfactant and Degradative Enzymes Mediated Crude Oil Degradation by Bacterium *Bacillus subtilis* A1. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00193>
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C., & Deka, S. (2017). Characterization of Biosurfactant Produced during Degradation of Hydrocarbons Using Crude Oil As Sole Source of Carbon. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00279>

- Peña, S., Zambrano, E., Baquerizo, J., Antón, A., & Solórzano, K. (2019). Nuevos sistemas de tratamientos de suelo contaminado por hidrocarburos. *Revista Iberica de Sistemas e Tecnologías de Informacao*, 226–236.
- Pérez, A. (2020). Estado actual de la contaminación del suelo en Europa: la fitorrecuperación como tecnología plausible para abordar el problema.
- Pérez, M. (2018). Evaluación de la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando *Pseudomonas fluorescens*.
- Pérez, S., Coto, O., Echemendía, M., & Ávila, G. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno? *Revista de Protección Vegetal*, 30(3), 225–234.
- Pérez, V., Ventura, L. M. C., Gutiérrez, F. A., Pérez, I., Hernández, M., & Enciso, S. (2020). The potential of *Mimosa pigra* to restore contaminated soil with anthracene and phenanthrene. *Revista Terra Latinoamericana*, 38(4), 755–769. <https://doi.org/10.28940/TERRA.V38I4.603>
- Pozzo, M. (2018). La biorremediación aplicada a la rehabilitación de suelos contaminados con hidrocarburos. In M. Brutti, M. Beltrán, & I. García de Salamone (Eds.), *Biorremediación de los recursos naturales* (1st ed.).
- Quijano, A., Navia, J., & Portilla, M. C. (2014). Contaminantes prioritarios en truchas arcoiris (*Oncorhynchus Mykiss*) del municipio de Mutiscua, norte de Santander, Colombia. *Temas Agrarios*, ISSN-e 0122-7610, Vol. 19, N°. 2, 2014, Págs. 194-205, 19(2), 194–205. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5332045&info=resumen&idioma=SPA>
- Quijano, A., Quijano, M., & Meléndez, I. (2017). Genotoxicidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos extraídos mediante el sistema diclorometano-etanol-tolueno en muestras del aire de Cúcuta, Norte de Santander, Colombia. *Acta Toxicológica Argentina*, 25(1), 1–11.

- Quispe, J. M. M. (2019). Identificación y determinación de la biomasa de bacterias nativas de suelo contaminado por hidrocarburos producto de la biodegradación a diferentes concentraciones de Diésel B5. *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa*. <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/9912>
- Raiger, L. J., & López, N. I. (2018). Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Química Viva*. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/84389>
- Ramadass, K., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2018). Bioavailability of weathered hydrocarbons in engine oil-contaminated soil: Impact of bioaugmentation mediated by *Pseudomonas* spp. on bioremediation. *The Science of the Total Environment*, 636, 968–974. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.04.379>
- Ramírez, B., Ramírez, G., Estrella, N., & Ruiz, A. (2002). Análisis del uso de muestreo estadístico en suelos contaminados por hidrocarburos: experiencia en el estado de Veracruz.
- Ramírez, J., Solís, G., & Gómez, C. (2001). Regulación genética en respuesta al estrés calórico en *Escherichia coli*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 43(1), 51–63.
- Rendón, M. E., Villasís, M. Á., Rendón, M. E., & Villasís, M. Á. (2017). El protocolo de investigación V: el cálculo del tamaño de muestra. *Revista Alergia México*, 64(2), 220–227. <https://doi.org/10.29262/RAM.V64I2.267>
- Restrepo, J. (2021). Métodos analíticos aplicados en la cuantificación de la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo.
- Rivera, H., Martínez, E. P., Osorio, J., & Martínez, E. (2010). Respuesta de biosurfactantes producidos por *Pseudomonas fluorescens* para el control de la gota de la papa *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary, bajo condiciones controlada. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 11(1), 21–30. https://doi.org/10.21930/rcta.vol11_num1_art:191

- Rivera, P., Rivera, R., Andrade, E., Heyer, L., de la Garza, F., & Castro, B. (2018). Bioestimulación y biorremediación de recortes de perforación contaminados con hidrocarburos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(2), 249–262.
- Rodríguez, C., Zuñiga, C., & Barboza, C. (2012). Evaluation of growth in diesel fuel and surfactants production ability by bacteria isolated from fuels in Costa Rica / Evaluación de crecimiento en combustible Diesel y capacidad de producción de surfactantes en bacterias aisladas de combustibles en Costa Rica. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32(2), 116–120.
- Rodríguez, E. P. (2018). Biorremediación de los suelos contaminados con hidrocarburos provenientes de la Estación de Secoya utilizando un consorcio bacteriano aerobio a escala de laboratorio. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/10468>
- Salcedo, S., Moreno, S., & Rocha, A. (2019). Biorremediación con algas. *Botánica Aplicada*, 15(26), 24–29.
- Sánchez, A., Rodríguez, I. C., & Wu, X. (2017). Revisión de la Caracterización de *Aeromonas* spp. Y su Importancia clínica. *Revista Boliviana de Química*, 34(5), 132–137. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602017000500001&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Sanchez, J. (2018). Microfotografía de *Bacillus thuringiensis*. https://www.researchgate.net/profile/Juan-Sanchez-Yanez/publication/339041099/figure/fig1/AS:855062976921602@1580874308843/Figura-1-Microfotografia-al-microscopio-de-luz-100-X-de-Bacillus-thuringiensis-var_Q320.jpg

- Santos, O. (2017). Detección e identificación de Biosurfactantes y/o Bioemulsificantes producidos por aislados bacterianos asociados a una Fosa petrolera de la Faja Petrolífera del Orinoco. <http://saber.ucv.ve/handle/10872/16817>
- Sarti, G. (2019). Metabolitos con actividad antifúngica producidos por el Género *Bacillus*. *Terra Mundus*, 5(1), 40-51(2019). <http://dspace.uces.edu.ar:8180/jspui/handle/123456789/5377>
- Shokouhfard, M., Kermanshahi, R. K., Shahandashti, R. V., Feizabadi, M. M., & Teimourian, S. (2015). The inhibitory effect of a *Lactobacillus acidophilus* derived biosurfactant on biofilm producer *Serratia marcescens*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 18(10), 1001. [/pmc/articles/PMC4686570/](http://pmc/articles/PMC4686570/)
- Shukla, S. K., Mangwani, N., Rao, T. S., & Das, S. (2014). Biofilm-Mediated Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 203–232. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00008-X>
- Sinc. (2015). Una micobacteria podría sustituir el tratamiento actual del cáncer de vejiga. <https://www.agenciasinc.es/Noticias/Una-micobacteria-podria-sustituir-el-tratamiento-actual-del-cancer-de-vejiga>
- Sosa, D. (2012). Técnicas de toma y remisión de muestras. INTA.
- Stefanova, M., Ivo, P., Sala, A. L., Damasceno, J. P. S., Abi, & Marques, S. A. (2009). Optimización de la recuperación de *Pseudomonas syringae* pv. tabaci por la modificación de dos medios de cultivo. *Tropical Plant Pathology*, 34(3), 178–181. <http://www.coresta.org/reports/seed-integrity-TF->
- Tabares, S. M., & Pareja, J. E. (2021). Análisis de información contable sobre impacto ambiental y su mitigación en Colombia en dos sectores industriales. *Bracken, R., Menninger, D., Poremba, M y Katz, R. (2006). The Oil Age: World Oil Production 1859-2050.*

[Http://Scimaps.Org/Maps/Map/The_oil_age_world_oi_73/Detail](http://Scimaps.Org/Maps/Map/The_oil_age_world_oi_73/Detail).

<https://repository.ucc.edu.co/handle/20.500.12494/34801>

Tabuchi, T., Martínez, D., Hospinal, M., Merino, F., & Gutiérrez, S. (2015). Optimización y modificación del método para la detección de ramnolípidos. *Revista Peruana de Biología*, 22(2).

Taringa. (2010). La bacteria marina *Alcanivorax borkumensis*: “La Nueva Esperanza de Ecologista.” https://www.taringa.net/+ecologia/la-bacteria-marina-alcanivorax-borkumensis-la-nueva-e_13e0wj

Toribio, J., Romero, Y., Rodríguez, M. Á., Chávez, J. D., Guevara, J., & Aguirre, J. L. (2014). *Pseudomonas* sp productoras de biosurfactantes. <https://doi.org/10.16/CSS/JQUERY.DATATABLES.MIN.CSS>

Torri, S. I., Cabrera, M. N., & Alberti, C. (2018). Respiración potencial durante la bioestimulación de un suelo contaminado con hidrocarburos aromáticos policíclicos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(1), 127–136. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.01.11>

Troncoso, C., Pavez, M., Santos, A., Salazar, R., & Barrientos, L. (2017). Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia Antibiótica. *International Journal of Morphology*, 35(4), 1214–1223. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022017000401214>

Ugaz, J. (2020). Microorganismos aislados de borras de hidrocarburos en la refinería de Talara y su potencial para la biorremediación de suelo contaminado, marzo de 2018. <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/8508>

Ugaz, J., Vega, H., Iglesias, S., & Carreño, C. (2020). Biosurfactantes en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. <https://doi.org/10.1590/SCIELOPREPRINTS.642>

- Vargas, A., & García, J. (2020). El impacto del sector minero energético en el desarrollo social de las regiones: en caso del Catatumbo, Colombia. <https://doi.org/10.15332/DT.INV.2020.01312>
- Vásquez, A., Montes, E., & Lara, M. (2018). Obtención de cepas productoras de biosurfactantes a partir de suelos contaminados artificialmente por crudo. *Congreso Internacional Ingeniería y Ciencias Químicas*, 288–309.
- Velásquez, A. (2016). Contaminación de suelos y cuerpos de agua por hidrocarburos en Colombia. Fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación.
- Vera, J. (2021). Terrorismo como Detonante de Desastres: Atentados Terroristas Contra Oleoducto Caño Limón Coveñas en Colombia. *REDER*, 5(1), 126–136. <http://www.revistareder.com/ojs/index.php/reder/article/view/65>
- Vijayakumar, S., & Saravanan, V. (2015). Biosurfactants-types, sources and applications. *Research Journal of Microbiology*, 10(5), 181–192. <https://doi.org/10.3923/JM.2015.181.192>
- Villalobos, J., & Niño, G. (2020). Caracterización de Consumo de Hidrocarburos Totales de Petróleo y Fijación de Nitrógeno Atmosférico por *Kribbella* sp Nativa del Piedemonte Llanero. <https://repository.usta.edu.co/handle/11634/28200>
- Volke, Tania., Velasco, J. Antonio., & Rosa, D. A. de la. (2005). Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=311149>
- Wikimedia. (2017). *Acinetobacter_baumannii*. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/87/Acinetobacter_baumannii.JPG

- Wikimedia. (2021). *Bacillus_cereus*.
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/95/Bacillus_cereus_Standard_I_col_100.jpg/1024px-Bacillus_cereus_Standard_I_col_100.jpg
- Xu, L., Shi, W., Zeng, X. C., Yang, Y., Zhou, L., Mu, Y., & Liu, Y. (2017). Draft genome sequence of *Arthrobacter* sp. strain B6 isolated from the high-arsenic sediments in Datong Basin, China. *Standards in Genomic Sciences*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/S40793-017-0231-9>
- Zamora, A., Ramos, J., & Arias, M. (2012). Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de Sabana. *Bioagro*, 24(1), 5–12. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612012000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es

9. Anexos

Anexo 1. Composición Medio Agar Petróleo

Composición	Unidad g/L
Pluripeptona	5.0
Extracto de levadura	3.0
Cloruro de sodio	8.0
Agar	15.0
Hidrocarburo	5 mL

Fuente: (Quispe, 2019).

Composición	Unidad g/L
KH ₂ PO ₄	1.0
K ₂ HPO ₄	0.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
CaCl ₂	0.02
NH ₄ NO ₃	1.0
Hidrocarburo	4.0
Agar	15.0

Fuente: (Barbosa, 2016).

Anexo 2. Composición Medio Agar Cromogénico

Composición	Unidad g/L
Peptona de Carne	18.0
Cloruro	10.0
Litio Extracto de Levadura	10.0
Triptona	6.0
Sodio Cloruro	5.0
di-Sodio Hidrógeno Fosfato anhidro	2.5
Glucosa	2.0
Sodio Piruvato	2.0
Magnesio Glicerofosfato	1.0
Magnesio Sulfato	0.5
Magnesio Sulfato	0.05
Agar Bacteriológico	13.5

Fuente: (Quispe, 2019).

Anexo 3. Composición Medio Agar Centrimide

Composición	Unidad g/L
Digerido pancreático de gelatina	20.0
Cloruro de magnesio	1.4
Sulfato de potasio	10.0
Bromuro de N-cetil N,N,N-Trimetil amonio (Cetrimide)	0.3
Glicerina	10.0 mL
Agua destilada	1000 mL
Agar	13.6

Fuente: (Quispe, 2019).

Anexo 4. Composición Medio Agar Bushnell Haas

Composición	Unidad g/L
NH ₄ NO ₃	1.0
FeCl ₃	0.05
KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄	0.2
CaCl ₂	0.02

Fuente: (Ali Khan et al., 2017).

Composición	Unidad g/L
Sulfato de magnesio	0.20
Cloruro de calcio	0.02
Fosfato mono potásico	1.00
Fosfato de hidrogeno di amónico	1.00
Nitrato de potasio	1.00
Cloruro férrico	0.05

Fuente: (Moreno & Abasolo, 2019).

Anexo 5. Composición Medio Agar Medio Mínimo Salino (MSM)

Composición	Unidad g/L
NaNO ₃	4.0
KH ₂ PO ₄	1.5
Na ₂ HPO ₄	0.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.0011

CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.0132
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
Agar	20.0

Fuente: (Liporace et al., 2019; Liporace, 2018).

Composición		Unidad g/L
NH ₄ NO ₃		4.0
KCl		0.1
KH ₂ PO ₄		0.5
K ₂ HPO ₄		1.0
CaCl ₂		0.01
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O		0.01
Extracto de levadura		0.1
Solución de oligoelementos	H ₃ BO ₃	0.26
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.5
	MnSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂ · 4H ₂ O	0.06
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.7

Fuente: (Patowary et al., 2017).

Composición	Unidad mg/L
(Ca (NO ₃) ₂)	60
NaHCO ₃	125
KNO ₃	70
NH ₄ Cl	70
KH ₂ PO ₄	100
FeSO ₄ .7H ₂ O	10
MnCl.H ₂ O	7
ZnSO ₄	1.5
Extracto de levadura al 0.4% v/v	
Queroseno 1% v/v	

Fuente: (Erlinton et al., 2018).

Anexo 6. Composición Medio Agar Luria-Bertani (LB)

Composición	Unidad g/L
Tripteína bacteriológica	10.0
Extracto de levadura	5.0

Cloruro de sodio	10.0
Agar	15.0

Fuente: (Liporace, 2018)

Composición	Unidad g/L
peptona	10.0
Extracto de levadura	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0

Fuente: (Hanano et al., 2017)

Composición	Unidad g/L
Triptona	10.0
Extracto de levadura	5.0
Cloruro de sodio	10.0
Agar	15.0

Fuente: (Parthipan et al., 2017)

Anexo 7. Composición Medio de Cultivo R2A

Composición	Unidad g/L
Glucosa	0.5
Proteasa peptona	0.5
Extracto de levadura	0.5
Almidón soluble	0.5
Piruvato de sodio	0.3
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05
K ₂ HPO ₄	0.3
Casamino ácidos	0.5
Agar	15.0

Fuente: (Becerra & Horna, 2016).

Anexo 8. Composición Medio Plate Count Agar (PCA)

Composición	Unidad g/L
Caseína	5.0
Extracto de levadura	2.5
Glucosa	1.00
Agar	15.0

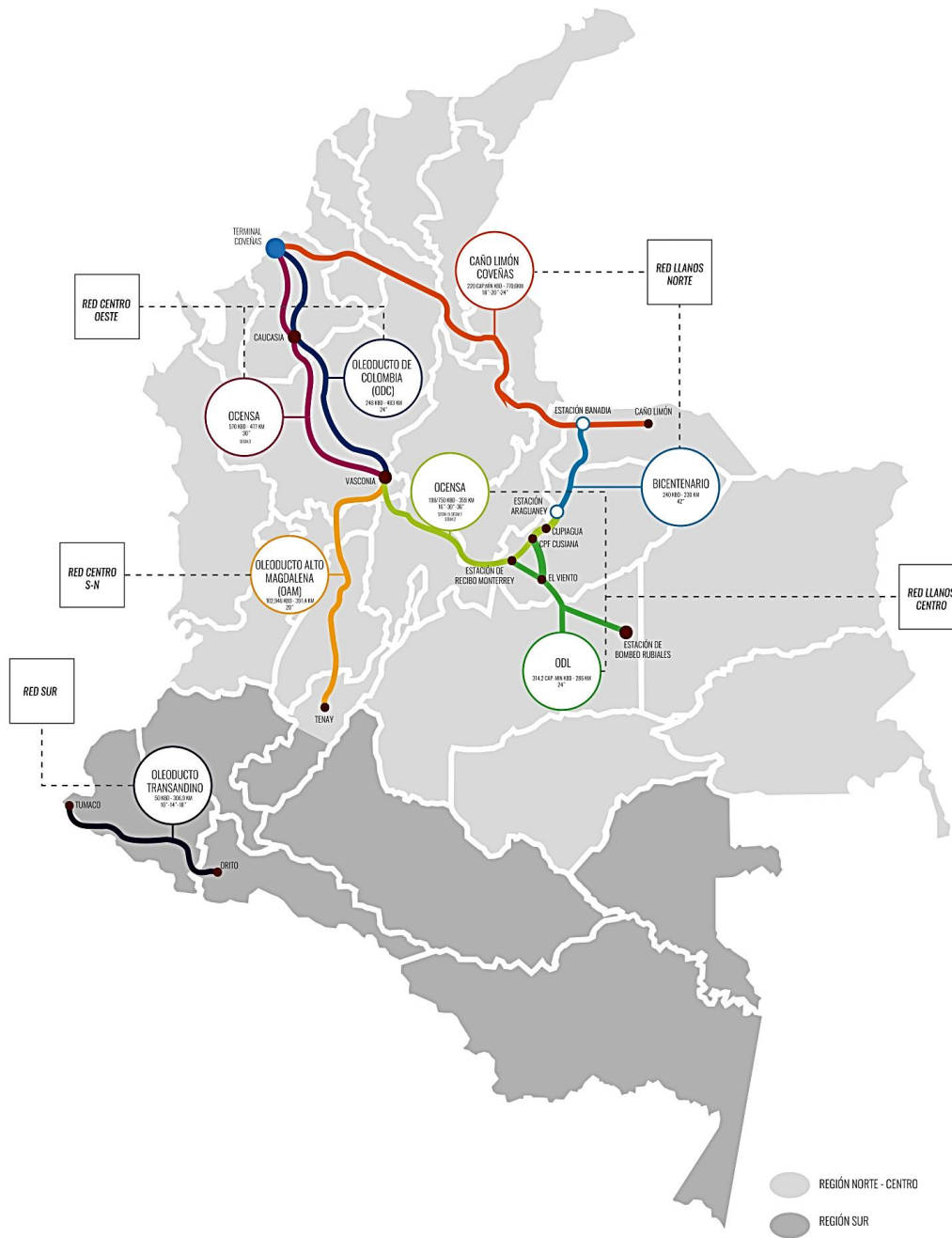
Fuente: (Moreno & Abasolo, 2019)

Anexo 9. Composición Medio Agar Siegmund Y Wagner

	Composición	Unidad g/L
Base mínima de sales	NaNO ₃	1g/L
	KH ₂ PO ₄	0,1 g/L
	CaCl ₂	0,1 g/L
	Extracto de levadura	0,2 g/L
	MgSO ₄ *H ₂ O	0,1 g/L
	Glicerol	2%
	Bromuro de cetiltrimetil- amonio (CETAB)	0,2 g/L
	Azul de metileno	0,005 g/L

Fuente: (Becerra & Horna, 2016)

Anexo 10. Mapa: Redes de oleoducto en Colombia



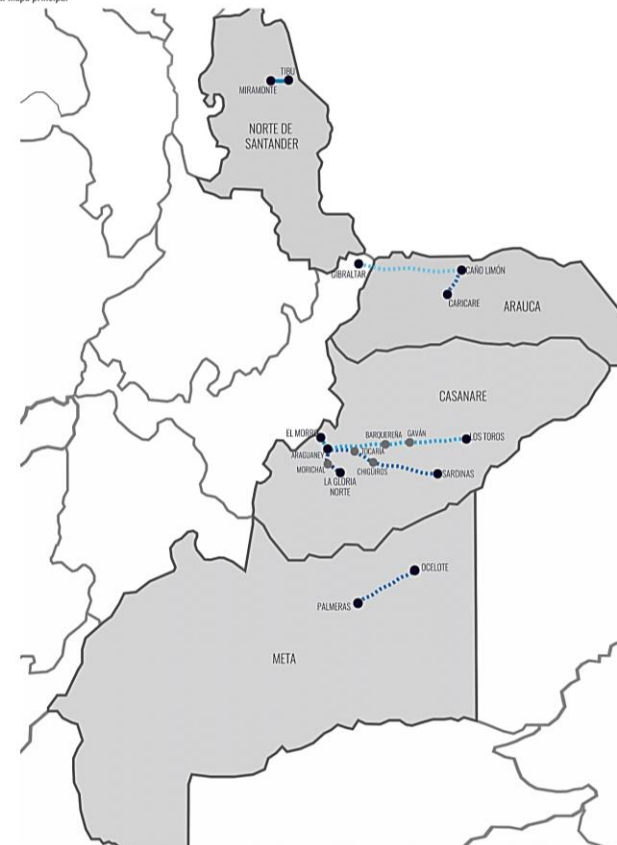
Fuente: (Minenergía, 2021).

Anexo 11. Mapa Oleoductos: Red Llanos Norte - Colombia



RED LLANOS NORTE

Volver al mapa principal



RED	TRONCALES	LONGITUD (KM)	RANGO DIAMETROS (IN)	RANGO CAPACIDAD EFECTIVA (KBOD)	VOLUMEN TRANSPORTADO 2019 (KBOD)	FACTOR DE UTILIZACIÓN FUE (%)	FACTOR DE SERVICIO (FS)
LLANOS NORTE	CAÑO LIMÓN - COVENAS	770,6	18-24	220 - 278	41,7	15	90,2
	BICENTENARIO	230	42	240	9,5	4	97

Fuente: (Minenergía, 2021)