



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA



Diseño de un consorcio bacteriano sintético con capacidad de degradar petróleo crudo

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

BIÓI. KAREN PLATA OLIVEROS

DIRECTORA: DRA. MARÍA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ

CUERNAVACA, MORELOS

Julio, 2023

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CeIB-UAEM), bajo la dirección de la Dra. María del Refugio Trejo Hernández.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María del Refugio Trejo Hernández y al Dr. Fernando Martínez Morales, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental, del Centro de Investigación en Biotecnología (CeIB). Por sus valiosas enseñanzas y aportes hacia este trabajo de investigación y por su gran apoyo. Gracias totales.

A la Dra. Irene Perea Arango, al Dr. Hugo Albeiro Saldarriaga Noreña y al Dr. Mario Murillo Tovar, por aceptar formar parte de mi comité tutorial, por sus aportaciones y sugerencias para la realización de este proyecto.

Al Dr. Daniel Morales Guzmán, por todas sus enseñanzas en la realización de las técnicas analíticas que se requirieron a lo largo de este proyecto y por su apoyo para la realización del análisis estadístico.

A Conacyt por la beca de maestría otorgada, no. de becario 785056.

A mis hermanos Gaby y Mauro Alberto por apoyarme, motivarme y siempre estar en los buenos y malos momentos, los amo infinito.

A mis amigas Monica Lilian y Belem por su valiosa amistad desde que íbamos en la licenciatura, por motivarme y siempre estar para mí ante cualquier situación, a pesar de la distancia, las amo demasiado.

A Arturo, por confiar en mí, y enseñarme a nunca darme por vencida.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biotecnología Ambiental, Dulce, Pilar, Andrés, Marco.

DEDICATORIA

A mis padres, Mauro Plata Sánchez y Amada Oliveros García, por el apoyo que me brindan, por darme ánimos y motivarme día a día a ser mejor. Porque no existe un amor tan incondicional como el de ustedes. Los amo para siempre.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1.- Introducción..... | 1 |
| 1.1.- Composición y clasificación del petróleo | 1 |
| 1.2.- Clasificación de los HCs del petróleo | 2 |
| 1.3.- Contaminación ambiental por HCs del petróleo | 3 |
| 1.4.- Derrames de petróleo en México..... | 4 |
| 1.5.- Métodos de eliminación de HCs del petróleo en ambientes contaminados. | 4 |
| 1.6.- Biorremediación de ambientes contaminados por HCs del petróleo | 5 |
| 1.7.- Consorcios bacterianos naturales degradadores de HCs..... | 5 |
| 1.8.- Consorcios bacterianos sintéticos | 7 |
| 1.9.- Rutas metabólicas involucradas en la degradación..... | 8 |
| 1.10.- Producción de Biosurfactantes | 9 |
| 1.11.- Factores que intervienen en la biodegradación de HCs | 10 |
| 1.12.- Biodegradabilidad | 11 |
| 2.- Antecedentes directos..... | 11 |
| 3.- Justificación..... | 13 |
| 4.- Hipótesis | 13 |
| 5.- Objetivos | 14 |
| 5.1.- Objetivo general: | 14 |
| 5.2.- Objetivos particulares | 14 |
| 6.- Estrategia experimental..... | 15 |
| 7.- Materiales y Métodos | 16 |
| 7.1.- Bacterias iniciales | 16 |
| 7.2.- Caracterización de las cepas..... | 18 |
| 7.2.1.- Caracterización morfológica..... | 18 |
| 7.2.2.- Tinción de Gram..... | 18 |
| 7.3.- Degradación del petróleo crudo por cada cepa individual | 19 |
| 7.4.- Índice de emulsión (IE_{24}) por las cepas individuales..... | 19 |
| 7.5.- Tensión superficial por las cepas individuales..... | 20 |
| 7.6.- Extracción del hidrocarburo | 20 |

| | |
|---|----|
| 7.7.- Análisis cromatográfico..... | 20 |
| 7.8.- Cinéticas de crecimiento..... | 21 |
| 7.9.- Diseño de los consorcios bacterianos | 21 |
| 8.- Resultados y discusión..... | 22 |
| 8.1.- Caracterización morfológica y tinción de Gram | 22 |
| 8.2. Degradación de petróleo crudo por cada cepa individual | 25 |
| 8.3.- Cinéticas de crecimiento bacteriano | 29 |
| 8.4.- Diseño del consorcio bacteriano..... | 35 |
| 8.5.- Biodegradación de HCs por los consorcios bacterianos..... | 37 |
| 8.6 Comparación de la Biodegradación de HCs por cepas individuales y en consorcio | 40 |
| 8.7.- Estudio del efecto de las cepas individuales | 56 |
| 8.8.- Análisis del efecto de las interacciones entre las cepas | 57 |
| 8.9.- Diseño del consorcio final..... | 59 |
| 9.- Conclusiones..... | 60 |
| 10.- Perspectivas..... | 61 |
| 11.- Bibliografía | 62 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Fig.1.- Estructura de algunos HCs del petróleo (García-Cruz y Aguirre-Macedo, 2014) | 3 |
| Fig.2.- Destino final del petróleo crudo (Tomado de Rojas., 2023)..... | 4 |
| Figura 3.- Ejemplo de realización de reacciones complejas por una sola población y por un consorcio. Para la generación de un sustrato (S) a un producto (P) se requieren muchos pasos, los cuales pueden realizarse a través de intermediarios (X_1 y X_2). Tomada de Brenner <i>et al.</i> , 2008..... | 6 |
| Fig.4.- Metodología de la obtención de un consorcio bacteriano sintético, a partir de un consorcio natural (Tomado de Rosas Díaz., 2020). | 8 |
| Fig. 5.- Biosurfactante (ramnolípido) producido por <i>Pseudomonas sp</i> que favorece el consumo de HCs (tomado de Das y Chandran., 2011). | 10 |
| Fig.6.- Mapa del sitio de recolección de las cepas incluidas en el estudio. | 16 |
| Figura 7.- Regresión lineal de las cinéticas de crecimientos de las 12 cepas individuales (incisos A-L)..... | 34 |
| Fig. 8.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE ₂₄ de la cepa <i>Pseudoalteromonas sp</i> individualmente y en consorcio..... | 41 |
| Fig. 9.- Comparación del perfil cromatográfico de <i>Pseudoalteromonas sp</i> individualmente y en consorcio. | 42 |
| Fig. 10.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE ₂₄ de la cepa <i>Shewanella sp</i> individualmente y en consorcio. | 43 |
| Fig. 11.- Comparación del perfil cromatográfico de <i>Shewanella sp</i> individualmente y en consorcio. | 43 |
| Fig. 12.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE ₂₄ de la cepa <i>Enterobacter sp</i> individualmente y en consorcio. | 44 |
| Fig. 13.- Comparación del perfil cromatográfico de <i>Enterobacter sp</i> individualmente y en consorcio. | 44 |
| Fig. 14.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE ₂₄ de la cepa <i>Bacillus subtilis</i> , individualmente y en consorcio. | 46 |
| Fig. 15.- Comparación del perfil cromatográfico de <i>Enterobacter sp</i> individualmente y en consorcio. | 46 |
| Fig. 16.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE ₂₄ de la cepa <i>Thalassospira sp</i> , individualmente y en consorcio. | 47 |
| Fig. 17.- Comparación del perfil cromatográfico de <i>Thalassospira sp</i> individualmente y en consorcio. | 47 |

| | |
|---|----|
| Fig. 18.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE ₂₄ de la cepa <i>Citrobacter sp</i> , individualmente y en consorcio. | 48 |
| Fig. 19.- Comparación del perfil cromatográfico de <i>Citrobacter sp</i> individualmente y en consorcio. | 48 |
| Fig. 20.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE ₂₄ de la cepa <i>Micrococcus luteus</i> , individualmente y en consorcio. | 49 |
| Fig. 21.- Comparación del perfil cromatográfico de <i>Micrococcus luteus</i> individualmente y en consorcio. | 49 |
| Fig. 22.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE ₂₄ de la cepa <i>Erwinia sp</i> , individualmente y en consorcio. | 50 |
| Fig. 23.- Comparación del perfil cromatográfico <i>Erwinia sp</i> individualmente y en consorcio. | 51 |
| Fig. 24.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE ₂₄ de la cepa <i>Vibrio sp</i> , individualmente y en consorcio. | 51 |
| Fig. 25.- Comparación del perfil cromatográfico de <i>Vibrio sp</i> individualmente y en consorcio. | 52 |
| Fig. 26.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE ₂₄ de la cepa <i>Bacillus cereus</i> , individualmente y en consorcio. | 53 |
| Fig. 27.- Comparación del perfil cromatográfico <i>Bacillus cereus</i> individualmente y en consorcio. | 53 |
| Fig. 28.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE ₂₄ de la cepa <i>Microbacterium sp</i> , individualmente y en consorcio. | 54 |
| Fig. 29.- Comparación del perfil cromatográfico <i>Microbacterium sp</i> individualmente y en consorcio. | 54 |
| Fig. 30.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE ₂₄ de la cepa <i>Idiomarina sp</i> , individualmente y en consorcio. | 55 |
| Fig. 31.- Comparación del perfil cromatográfico <i>Idiomarina sp</i> individualmente y en consorcio. | 55 |
| Fig. 32.- Gráfica del efecto de cada una de las cepas de manera individual, cada letra corresponde a una cepa. Las más cercanas a 1, son las que tuvieron un mayor efecto, por lo tanto, son mejores. | 57 |
| Fig. 33.- Análisis de las interacciones dobles entre cepas. | 58 |
| Fig. 34.- Gráfica representativa del % de degradación del petróleo crudo que se obtendría al mezclar las cepas mas significativas estadísticamente en la remoción del petróleo. | 59 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación del petróleo según su gravedad API (Rodríguez, 2014). | 1 |
| Tabla 2.- Sitio y profundidad, donde se recolectaron los aislados incluidos en el estudio..... | 17 |
| Tabla 3.- Bacterias con capacidad para degradar diferentes tipos de HCs | 17 |
| Tabla 4.- Caracterización morfológica y tinción de Gram de las cepas seleccionadas..... | 23 |
| Tabla 5.- Porcentaje de degradación, TS (mN/m) e IE ₂₄ de las cepas a 30 días.. | 25 |
| Tabla 6.- Comparación del porcentaje de degradación de las cepas a 12 y 30 días. | 27 |
| Tabla 7.- Velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) y tiempo de duplicación (t_d) de las cepas | 35 |
| Tabla 8.- Diseño simplex reticular (simplex-lattice) aumentado, de 12 días de degradación..... | 36 |
| Tabla 9.- Diseño <i>simplex reticular (simplex-lattice) aumentado</i> , de 30 días de degradación..... | 37 |
| Tabla 10.- Resultados obtenidos con respecto al porcentaje de degradación, TS (mN/m) e IE ₂₄ de las mezclas a los 12 días..... | 38 |
| Tabla 11.- Porcentaje de degradación, TS (mN/m) e IE ₂₄ de las mezclas a los 30 días. | 39 |
| Tabla 12.- Comparación del porcentaje de biodegradación de las mezclas en un lapso de 12 y 30 días. | 39 |
| Tabla 13.- Comparación del porcentaje de biodegradación de las cepas individuales con las cepas en consorcio, en un lapso de 30 días. | 56 |

ABREVIATURAS

API. American Petroleum Institute

DO. Densidad Óptica

DWH. Deepwater Horizon

EPS. Exopolisacáridos

HAPs. Hidrocarburos aromáticos policíclicos

HCs. Hidrocarburos

IE₂₄. Índice de Emulsión

PPM. Partes por millón

TS. Tensión superficial

Resumen

Los productos derivados del petróleo son la principal fuente de energía, tanto para la industria, como para la vida diaria. La contaminación por hidrocarburos (HCs) del petróleo es una de las preocupaciones más grandes hoy en día, esta se puede dar por fugas y derrames accidentales, los cuales, ocurren regularmente durante la exploración, producción, refinación, transporte y almacenamiento de petróleo y productos derivados de éste.

La aplicación de los procesos biológicos se ha convertido en una alternativa para reducir la contaminación por petróleo y sus derivados. Lo anterior debido al bajo costo, son altamente eficientes, causan poco daño al ambiente y favorecen la mineralización completa de los contaminantes. El petróleo es una mezcla compleja de muchos compuestos por lo que se requiere el uso de diferentes actividades metabólicas concertadas para degradar las diferentes fracciones del petróleo. Ya que se ha demostrado, gracias a numerosos estudios la existencia de más de 100 géneros de bacterias capaces de degradar los HCs del petróleo. El objetivo del presente trabajo fue diseñar un consorcio bacteriano sintético utilizando 12 cepas de origen marino aisladas del golfo de México. Los estudios demostraron que las cepas bacterianas seleccionadas tienen la capacidad de reducir la tensión superficial y producir biosurfactantes, los cuales permiten la solubilización de los HCs del petróleo favoreciendo los procesos degradativos. Los resultados de este proyecto de investigación demuestran que cuando las bacterias trabajan en conjunto, la degradación aumenta casi al doble, lo que nos indica que un consorcio bacteriano es más eficiente para degradar HCs que las cepas individuales.

1.- Introducción

1.1.- Composición y clasificación del petróleo

El petróleo consiste en una mezcla líquida con textura viscosa, que contiene miles de compuestos, entre los cuales se encuentran los hidrocarburos (HCs) que son moléculas compuestas por átomos de carbono e hidrógeno. La composición química del petróleo es de: 44% parafinas, 10% resinas y asfaltenos, 16% parafinas ramificadas y 30% de aromáticos.

El petróleo se puede clasificar según su densidad o gravedad API (American Petroleum Institute), como se muestra en la tabla 1:

Tabla 1. Clasificación del petróleo según su gravedad API (Rodríguez, 2014).

| Petróleo crudo | Densidad (g/cm ³) | Gravedad API |
|----------------|-------------------------------|--------------|
| Extrapesado | >1.0 | 10 |
| Pesado | 1.0 – 0.92 | 10.0 – 22.3 |
| Mediano | 0.92 – 0.87 | 22.3 – 31.1 |
| Ligero | 0.87 – 0.83 | 31.1 – 39 |
| Súper ligero | < 0.83 | >39 |

El petróleo también puede ser clasificado como crudo dulce (poco azufre), o ácido (mayores cantidades de azufre).

En México se producen tres tipos de crudo: el Maya-API22 pesado, que constituye casi la mitad del total de la producción; el Istmo-AP314, ligero, bajo en azufre, que representa casi un tercio del total de la producción; y el Olmeca-API39, extra ligero, aproximadamente la quinta parte del total de la producción (gob.mx, 2021)

En el mundo, los yacimientos petrolíferos se encuentran principalmente en el Golfo Pérsico. El petróleo se distribuye principalmente por el océano y al año se produce mundialmente cerca de cuatro mil millones de toneladas métricas de petróleo crudo (Harayama *et al.*, 1999; Fernández R., 2023).

1.2.- Clasificación de los HCs del petróleo

El petróleo está constituido de HCs, estos se clasifican en saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos. Estos se pueden separar mediante cromatografía de absorción utilizando disolventes de diferente polaridad, cada una de las fracciones obtenidas contiene muchos compuestos (Karsen y Larter, 1991). Los saturados no contienen dobles enlaces y se pueden clasificar de acuerdo con sus estructuras químicas en alcano (parafinas) y cicloalcanos (naftenos). Los alcanos a su vez tienen cadenas de carbono ramificadas o no ramificadas y su fórmula general es $C_nH_{2n + 2}$. Los cicloalcanos tienen uno o más anillos de átomos de carbono (ciclopentanos y ciclohexanos) y su fórmula general es C_nH_{2n} . La mayoría de los cicloalcanos del petróleo tienen uno o más anillos aromáticos con o sin sustituyentes alquilo. Los aromáticos tienen uno o más anillos aromáticos con o sin sustituyentes alquilo. El hidrocarburo aromático es el más simple, como se muestra en la figura 1.

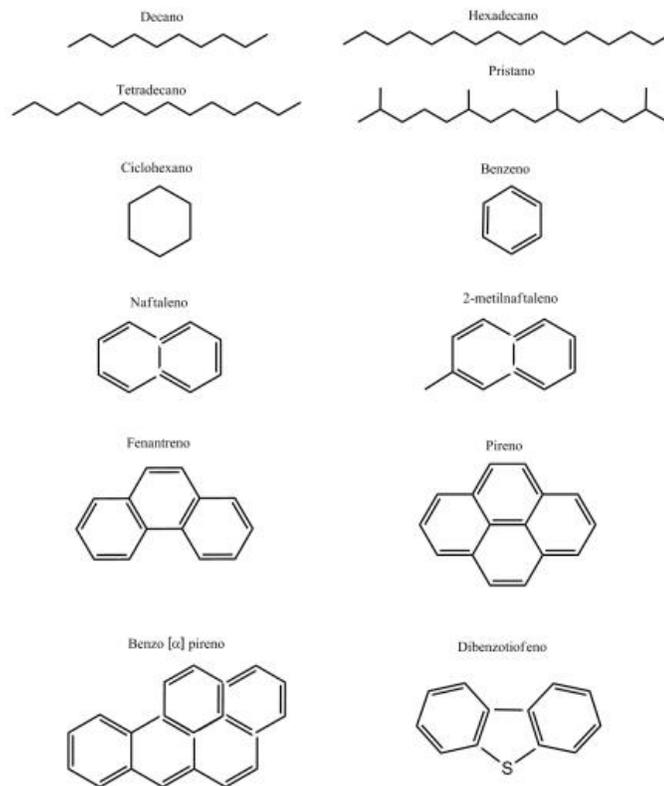


Fig.1.- Estructura de algunos HC del petróleo (García-Cruz y Aguirre-Macedo, 2014)

Las resinas como los asfaltenos contienen compuestos polares no hidrocarbonados a diferencia de las fracciones saturadas y aromáticas. Además de que sus elementos contienen carbono e hidrógeno, nitrógeno, azufre y oxígeno, los cuales pueden formar complejos con metales pesados.

Los asfaltenos son compuestos de alto peso molecular y las resinas contienen compuestos heterocíclicos ácidos y sulfóxidos (Harayama *et al.*, 1999).

1.3.- Contaminación ambiental por HCs del petróleo

La contaminación ambiental es uno de los desafíos más relevantes del mundo actual, ya que no sólo tiene efecto sobre la biodiversidad, sino también en la salud humana. Los HCs del petróleo constituyen uno de los principales contaminantes del ambiente, tanto en suelos como en los océanos. Sin embargo, son los principales contaminantes del medio marino y provienen en su mayoría de la escorrentía terrestre y de agua dulce, los desechos de las refinerías de petróleo costeras, las actividades del transporte marítimo, derrame accidental o por afloramientos naturales, conocidos como chapopoterías (fig. 1) (Deppe *et al.*, 2005; Malik y Ahmed., 2012).

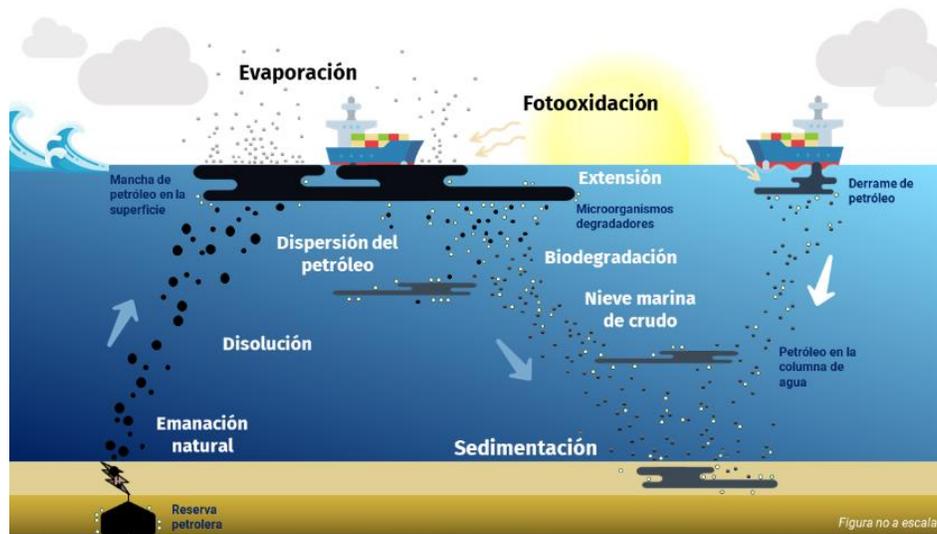


Fig.2.- Destino final del petróleo crudo (Tomado de Rojas., 2023).

La producción, el transporte, el uso y la eliminación a gran escala del petróleo a nivel mundial lo han convertido en un contaminante de gran importancia, tanto en prevalencia como en cantidad (Rahman *et al.*, 2002).

El destino final de los HCs del petróleo son los mares y océanos, por lo que son los principales contaminantes del medio marino (fig. 1) (Deppe *et al.*, 2005).

1.4.- Derrames de petróleo en México

México es un país petrolero, ya que su desarrollo y macroeconomía dependen de la producción de HCs. El Golfo de México es una de las áreas de mayor producción de petróleo, es ahí donde ha ocurrido el mayor accidente de derrame de petróleo en México, el cual fue debido a la explosión de la plataforma Deepwater Horizon (DWH) el 20 de abril del 2010, en tres meses se derramó cerca de 800 mil toneladas de petróleo (Herzka *et al.*, 2021).

1.5.- Métodos de eliminación de HCs del petróleo en ambientes contaminados

Existen diversos métodos para eliminar los HCs del petróleo, entre ellos se encuentran los métodos físicos que incluyen adsorción, flotación de aire, filtración de membrana, etc., y los métodos químicos que comprenden electrocoagulación, la oxidación húmeda, oxidación electrolítica, oxidación catalítica de ozono, entre otros, sin embargo, estos métodos suelen ser muy costosos y pueden producir contaminación secundaria.

1.6.- Biorremediación de ambientes contaminados por HCs del petróleo

Debido a las consecuencias negativas de los métodos físicos y químicos, se opta más por los métodos biológicos, como la biorremediación, en la que intervienen diversas especies de microorganismos, entre los cuales se encuentran las bacterias. (Malik y Ahmed., 2012).

La biorremediación es una forma sostenible de degradar contaminantes ambientales; se basa en la degradación de compuestos orgánicos, convirtiéndolos en energía, masa celular y productos de desecho biológicos, por dichos microorganismos, originando metabolitos menos tóxicos o inocuos para el medio ambiente o con el fin de realizar una mineralización generando H₂O, CO₂ (aeróbica) o CH₄ (anaeróbico) como productos finales. Los procesos de biorremediación ofrecen varias ventajas como, un bajo costo, un manejo seguro, además de que no generan impacto ambiental (García-Cruz y Aguirre-Macedo., 2014).

Las tasas de degradación y mineralización de muchos compuestos orgánicos de una población microbiana dependen de la concentración del compuesto, ya que se ha demostrado que, a una mayor concentración la tasa de degradación es menor (Rahman *et al.*, 2002).

1.7.- Consorcios bacterianos naturales degradadores de HCs

Se ha encontrado que alrededor de 100 géneros de bacterias tienen la capacidad de oxidar HCs (Cui et al., 2020), sin embargo, no existe en el mundo una sola cepa de bacterias con la capacidad metabólica de degradar todos los componentes que se encuentran en el petróleo crudo. La biodegradación del petróleo crudo en la naturaleza es realizada por diversas especies dentro de un consorcio de microorganismos con altas capacidades enzimáticas (Malik y Ahmed., 2012), ya que, generalmente las bacterias no se encuentran de manera aislada, sino que más bien se encuentran en asociaciones, formando consorcios, estos consorcios

bacterianos naturales pueden realizar diversas funciones, entre ellas la degradación de contaminantes, como lo es el petróleo.

Los consorcios bacterianos pueden realizar funciones complejas que una población bacteriana no podría realizar por sí sola, así mismo son más resistentes a las fluctuaciones ambientales. Normalmente los consorcios bacterianos se encuentran de manera natural en el ambiente y pueden estar formados con hasta 38 cepas bacterianas (Cui *et al.*, 2020). Los miembros del consorcio se comunican unos con otros intercambiando metabolitos o intercambiando señales, donde cada individuo de la población puede detectar y responder; esta comunicación les permite la división del trabajo (figura 2) (Brenner *et al.*, 2008).

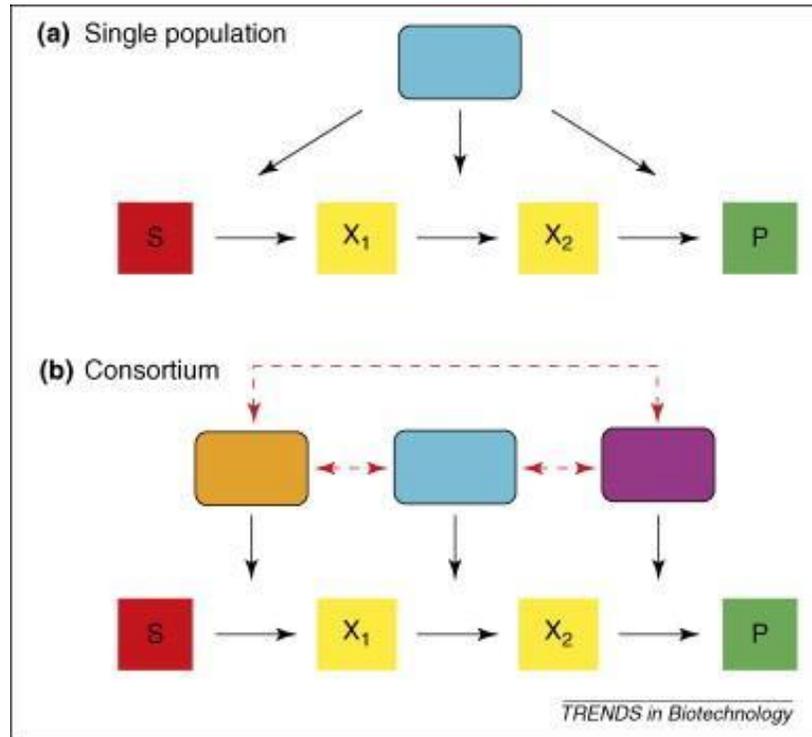


Figura 3.- Ejemplo de realización de reacciones complejas por una sola población y por un consorcio. Para la generación de un sustrato (S) a un producto (P) se requieren muchos pasos, los cuales pueden realizarse a través de intermediarios (X_1 y X_2). Tomada de Brenner *et al.*, 2008.

Gracias a la participación y combinación de los diferentes procesos metabólicos y a la participación de diferentes enzimas catalíticas de dichas bacterias presentes en

los ambientes marinos o terrestres, es posible alcanzar tasas de consumo de hasta el 100 % (Das y Chandran., 2011). Cada bacteria tiene afinidad por diversos tipos de HCs, por lo tanto, la biorremediación de la contaminación por HCs del petróleo requiere la acción conjunta de múltiples bacterias funcionales; es decir, los consorcios bacterianos son más eficientes para degradar HCs que una cepa individual, es así como se puede lograr el mejor efecto de restauración ambiental. (Xu et al., 2018).

1.8.- Consorcios bacterianos sintéticos

Un consorcio bacteriano sintético, es decir creado *in vitro* en un laboratorio (fig. 2) es más eficiente que un consorcio que se encuentra de manera natural en el ambiente, ya que en él se pueden controlar las condiciones óptimas de crecimiento, las proporciones de cada cepa y para ello, se tiene que saber el porcentaje de degradación de las cepas de manera individual (Cui *et al.*, 2020).

Se pueden construir cultivos mixtos que degraden el petróleo, combinando cepas que tengan capacidades degradantes conocidas y estudiadas (Malik y Ahmed., 2012; McGenity *et al.*, 2012),

Una característica importante de los consorcios microbianos es su capacidad para realizar funciones que requieren múltiples pasos. La diversidad resultante en las rutas metabólicas le permite realizar tareas más complejas y utilizar de manera más eficiente los recursos disponibles en su entorno. Los consorcios nos sirven como modelo para estudiar las interacciones que se pueden dar entre las poblaciones bacterianas durante un proceso de biorremediación ya que implican la acción concertada de diferentes microorganismos sobre un sustrato, mediante la combinación de sus actividades metabólicas cooperativas (Desai *et al.*, 2010).

Es importante estructurar espacialmente el entorno, para que las especies cooperen e interactúen, ya que si dos especies participan en competencia se dividirán espacialmente y como resultado obtendremos un consorcio laminado (Lindemann *et al.*, 2016).

Existen diversas formas para diseñar un consorcio bacteriano sintético (Jia *et al.*, 2016). Una de las cuales está basada en la función, este enfoque se centra en determinar primero una función para la comunidad y luego caracterizar la estructura y dinámica de la misma en detalle. Dentro de este enfoque, las comunidades microbianas “naturales” utilizadas en biotecnología son de mucho interés, ya que la producción o degradación de una sustancia en particular puede actuar como una medida objetiva de desempeño. En la figura 2 se puede observar cómo se obtiene un consorcio bacteriano sintético a partir de un consorcio natural.

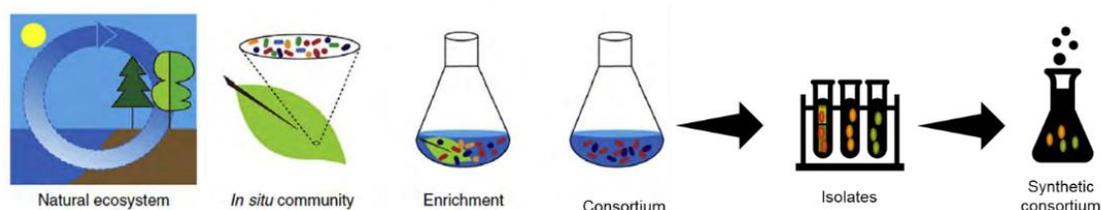


Fig.4.- Metodología de la obtención de un consorcio bacteriano sintético, a partir de un consorcio natural (Tomado de Rosas Díaz., 2020).

1.9.- Rutas metabólicas involucradas en la degradación

Se ha observado que durante la biodegradación de HCs del petróleo las diferentes fracciones son asimiladas a variadas tasas de consumo, esto es gracias a la respuesta a diferentes afinidades que presentan las bacterias a la amplia diversidad de compuestos del petróleo la cual dependerá de la estructura y del peso molecular. Por ejemplo, los alcanos lineales cuando son asimilados por las bacterias son metabolizados por la ruta de la β -oxidación produciendo alcohol como intermediario. Los alcanos-lineales entre C10 a C24 son los primeros en consumirse debido a la baja hidrofobicidad que presentan. En estudios llevados a cabo con *Pseudomonas* se observó que consumió primero a los alcanos entre C5 y C16 (Das y Chandran., 2011).

En el caso de los monoaromáticos, se ha observado que se degradan por diferentes rutas metabólicas, dependiendo de la estructura molecular del compuesto. De los HCs que conforman el btex (Benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos), el tolueno es el de mayor consumo bajo condiciones aerobias, sin embargo, dependiendo de las bacterias presentes en las zonas contaminadas, estas moléculas pueden seguir diferentes rutas metabólicas. Cuando se oxida un hidrocarburo poliaromático se forman dihidrodioles, posteriormente los intermediarios dihidroxilados pueden sufrir un ataque enzimático en las posiciones orto o meta para formar catecol o protocatecuato, y así finalmente entrar al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Das y Chandran., 2011).

1.10.- Producción de Biosurfactantes

Los biosurfactantes son metabolitos producidos por bacterias, se asocian a su crecimiento cuando los sustratos son hidrofóbicos (ejemplo aceites, HCs, etc). Los biosurfactantes tienen propiedades tensoactivas, emulsificantes y dispersantes, se clasifican por su alto o bajo peso molecular. Las bacterias utilizan este metabolito como herramienta para emulsionar las cadenas pesadas del petróleo crudo y así hacerlo más biodisponible para utilizarlo de manera más eficiente (Akbari *et al.*, 2018). Actualmente, diferentes líneas de investigación están orientadas a la producción de biosurfactantes para mejorar la degradación del petróleo crudo contaminado en los suelos (Patowary *et al.*, 2017). Los biosurfactantes comprenden principalmente diferentes tipos de lipopéptidos, exopolisacáridos glicolípidos (Lin *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2020). Por ejemplo, en la figura 4 se muestra el ejemplo de un biosurfactante.

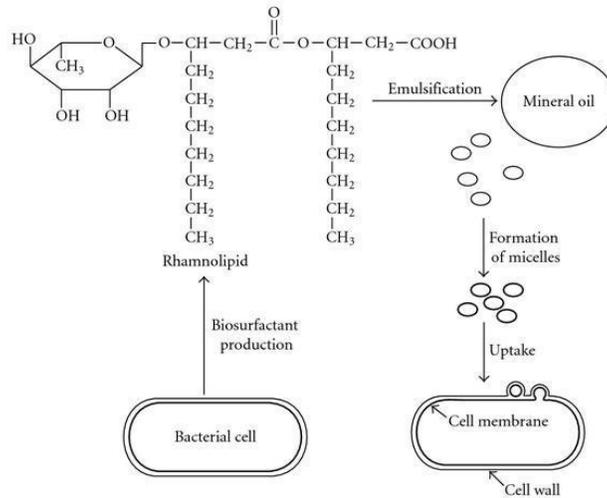


Fig. 5.- Biosurfactante (ramnolípido) producido por *Pseudomonas sp* que favorece el consumo de HC's (tomado de Das y Chandran., 2011).

1.11.- Factores que intervienen en la biodegradación de HC's

El alcance y la velocidad de biodegradación depende de muchos factores, incluyendo: pH, temperatura, oxígeno, la composición de la población microbiana y su grado de aclimatación, accesibilidad de nutrientes, la estructura química del compuesto y tiempo de la contaminación (Haritash y Kaushik, 2009; Vázquez *et al.*, 2009).

La temperatura juega un papel importante en la biodegradación de HC's, puesto que afecta directamente la fisiología y diversidad de los microorganismos, así como la química del petróleo. A temperaturas bajas el petróleo incrementa su viscosidad, se reduce la volatilidad de los compuestos de bajo peso molecular, que consecuentemente aumentan la toxicidad en microorganismos. En el Golfo de México se han aislado bacterias a diferentes profundidades de 1 000 hasta 1 200 metros, estas bacterias tienen la capacidad de degradar el petróleo a temperaturas alrededor de 4°C. No obstante, se ha observado que conforme se eleva la temperatura se incrementa la actividad microbiana, encontrando la mayor actividad

enzimática en bacterias mesofílicas y termofílicas en la superficie de los océanos (Das y Chandran., 2011).

Los HCs en ambientes salinos como es el agua de mar (3.5 % de NaCl) presentan altas tasas de consumo por parte de los microorganismos, estas tasas de consumo también se han observado en un rango entre 0.6 a 11.7 % de NaCl, sin embargo, a concentraciones superiores a 2.4 %, se ha observado inhibición del consumo de compuestos aromáticos (Salleh *et al.*, 2003).

1.12.- Biodegradabilidad

La biodegradación del petróleo depende de las características del hábitat, del contaminante y de los microorganismos; por tanto, es de gran importancia tener en cuenta cada uno de estos factores a la hora de aplicar un tratamiento biológico.

Como se mencionó anteriormente, el petróleo está constituido por distintas fracciones de HCs. La fracción alifática (con 18 a 35 átomos de carbono) es la más fácil de degradar, ya que está formada principalmente por *n*-alcanos, lo cuales se metabolizan más fácilmente por los microorganismos, La degradación se dificulta a medida que se incorporan a su estructura ramificaciones y anillos aromáticos, por lo tanto la fracción aromática (con uno o más anillos, como benceno, naftaleno, y fenantreno) es más compleja de metabolizar por los microorganismos, las resinas y asfaltenos al ser la fracción más recalcitrante debido a la complejidad de sus moléculas es aún más difícil de degradar (Acuña *et al.* 2010). El petróleo también posee compuestos orgánicos con sulfuro, nitrógeno y oxígeno, y constituyentes metálicos en poca proporción. Debido a la complejidad de la composición del petróleo, la biodegradación por parte de las bacterias dependerá de las proporciones que tenga de cada una de sus fracciones.

2.- Antecedentes directos

El laboratorio de Biotecnología ambiental (CEIB), forma parte de un proyecto global en conjunto con el Consorcio de investigación del Golfo de México (CIGOM), el

objetivo de dicho proyecto es el de establecer una línea base de las condiciones biogeográficas de esa área marina, con el fin de poder responder en el futuro ante posibles impactos ambientales relacionados con derrames ocasionados por la industria del petróleo. Se cuenta con una colección de cepas aisladas de la columna de agua y de sedimentos del Golfo de México. El muestreo fue realizado a distintas profundidades: a) zona superficial; b) máxima fluorescencia (hasta 200 m); c) zona mínima de oxígeno; d) zona de 1000 m; e) fondo y f) sedimentos. Las cepas fueron seleccionadas por su capacidad para producir biosurfactantes, moléculas de tipo anfipático que les permite solubilizar compuestos hidrofóbicos y utilizarlos como fuentes de carbono y energía (Morales-Guzmán *et al.*, 2020). Dichas bacterias pueden ser empleadas en los procesos de biorremediación de suelos o aguas contaminadas con HCs, ya que pueden favorecer la solubilización de los sustratos e incrementar la eficiencia de biodegradación de estos compuestos.

Las bacterias cultivables de estos consorcios se aislaron e identificaron mediante caracterización polifásica bacteriana. Una de las especies aislada y caracterizada fue *Enterobacter cloacae*, la cual presentó actividad biosurfactante. El extracto obtenido del biosurfactante de esta bacteria presentó una alta estabilidad térmica, en condiciones alcalinas y a salinidad elevada. Además, se analizó su genoma y se observó la presencia de genes *rhlAB* que codifican para la ramnosiltransferasa, requerida en la producción de ramnolípidos, y genes *alkAB*, que codifican para las enzimas alcano hidroxilasas, las cuales están relacionadas con la degradación de alcanos (Curiel- Maciel *et al.*, 2020).

Idiomarina es otro género bacteriano aislado y caracterizado de origen marino; se demostró que esta bacteria es capaz de producir exopolisacáridos (EPS) a 5, 15 y 25 °C; es capaz de formar biofilm y tiene la capacidad de utilizar HCs (Bahena., 2020).

Thalassospira sp. B6FA se aisló en altas concentraciones de queroseno y fue capaz de emulsionar diferentes HCs con índices de emulsión (EI24) de hasta 80 %. Sin embargo, el biosurfactante obtenido de esta cepa no presentó la capacidad de reducir la tensión superficial. El agente emulsionante se identificó como un terpeno. Esta cepa también fue capaz de degradar 50 % de HC diferentes después de 30

días y mostró potencial para su uso en la biorremediación de ambientes marinos contaminados con HC (Bertrand *et al.*, no publicado).

3.- Justificación

La contaminación por HCs del petróleo es una problemática de carácter mundial y amplia distribución geográfica, teniendo en cuenta que independiente de la zona afectada (lagos, suelos, zonas freáticas, ríos y playas) por procesos biológicos y físicos, los HCs tienen como destino final los mares y océanos.

México es un país petrolero, ya que su economía depende principalmente de este recurso, las zonas de mayor explotación petrolera están situadas en el golfo de México. Estas zonas se han visto afectadas en los últimos años por la contaminación de HCs, producto de las actividades domésticas, industriales y marítimas. Así mismo, debido a procesos relacionados con la explotación, transporte, manejo del petróleo y sus derivados, la selección de bacterias con capacidad de degradar los HCs sigue siendo tema de interés en diferentes grupos de investigación.

Actualmente se estudian microorganismos con capacidad para degradar HCs, sin embargo, debido a que el petróleo es una mezcla de muchos compuestos, se requiere el uso de múltiples cepas para mejorar la eficiencia de biodegradación, estas cepas se pueden seleccionar lo que nos traería diversas ventajas: elegir las mejores cepas, aprovechar las capacidades metabólicas de cada una de ellas, reducir los tiempos de los tratamientos, evitar la adición de sustancias tóxicas al ambiente.

4.- Hipótesis

Un consorcio bacteriano sintético compuesto por aislamientos bacterianos provenientes del golfo de México, es capaz de degradar petróleo crudo más eficientemente que un aislado individual.

5.- Objetivos

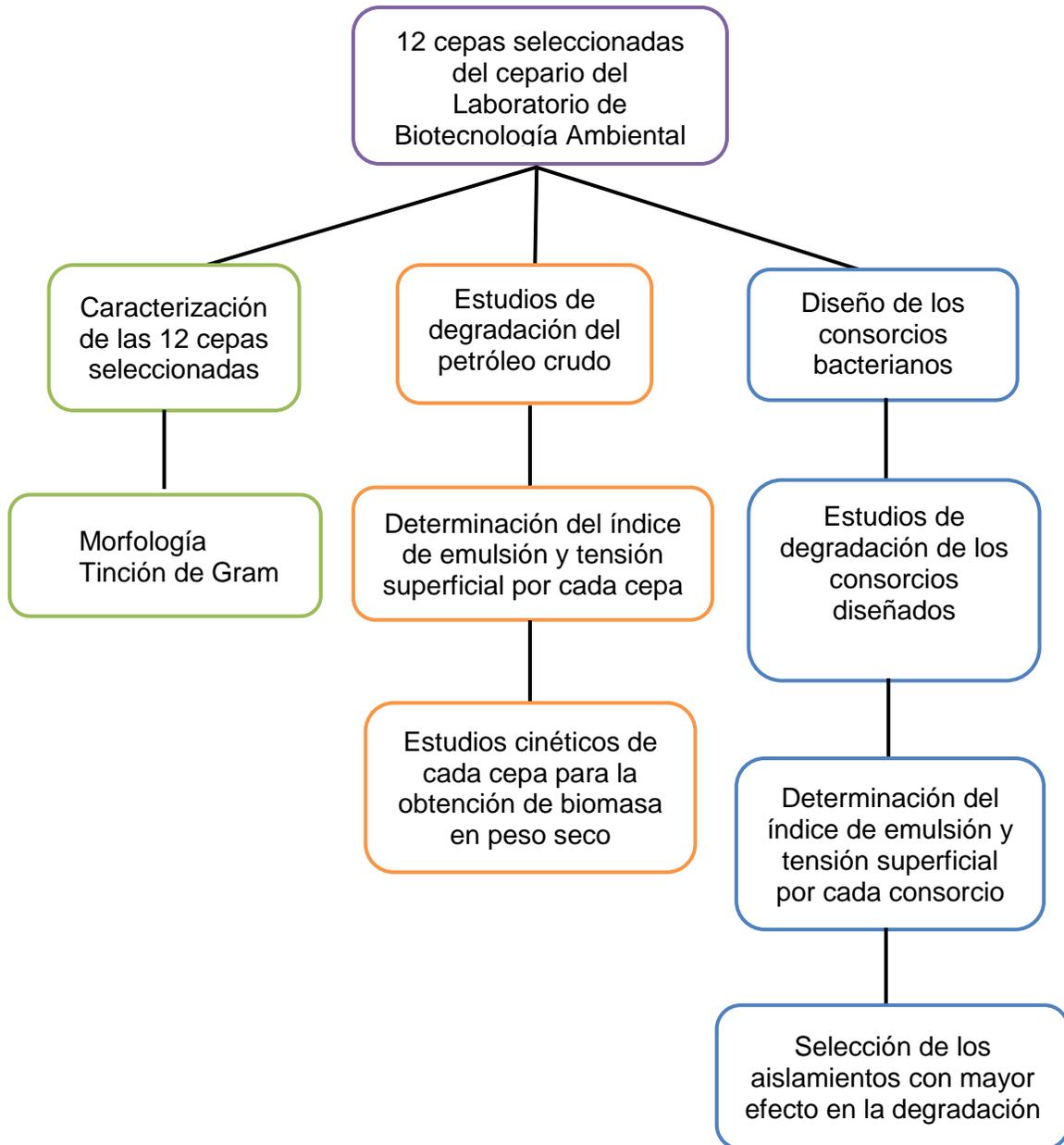
5.1.- Objetivo general:

Diseñar un consorcio especializado de bacterias marinas que degraden el petróleo crudo.

5.2.- Objetivos particulares

1. Evaluar el crecimiento y capacidad de degradación de las cepas aisladas del golfo de México, de manera individual en medio líquido marino.
2. Diseñar mezclas (consorcios) con dichos aislamientos por medio del software Designe-expert.
3. Evaluar la capacidad de degradación por los consorcios diseñados.
4. Seleccionar los aislamientos con mayor efecto sobre la remoción del petróleo crudo y con ello crear el consorcio final.

6.- Estrategia experimental



7.- Materiales y Métodos

7.1.- Bacterias iniciales

El diseño del consorcio partió de 12 cepas bacterianas, las cuales fueron aisladas de muestras de la columna de agua y de sedimentos del Golfo de México (Fig. 4) en trabajos previos al presente estudio.

Las 12 cepas (Tabla 4) fueron reactivadas de alícuotas de la biomasa bacteriana conservada en una solución de glicerol a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ las cuales se encontraban en el cepario del Laboratorio de Biotecnología Ambiental

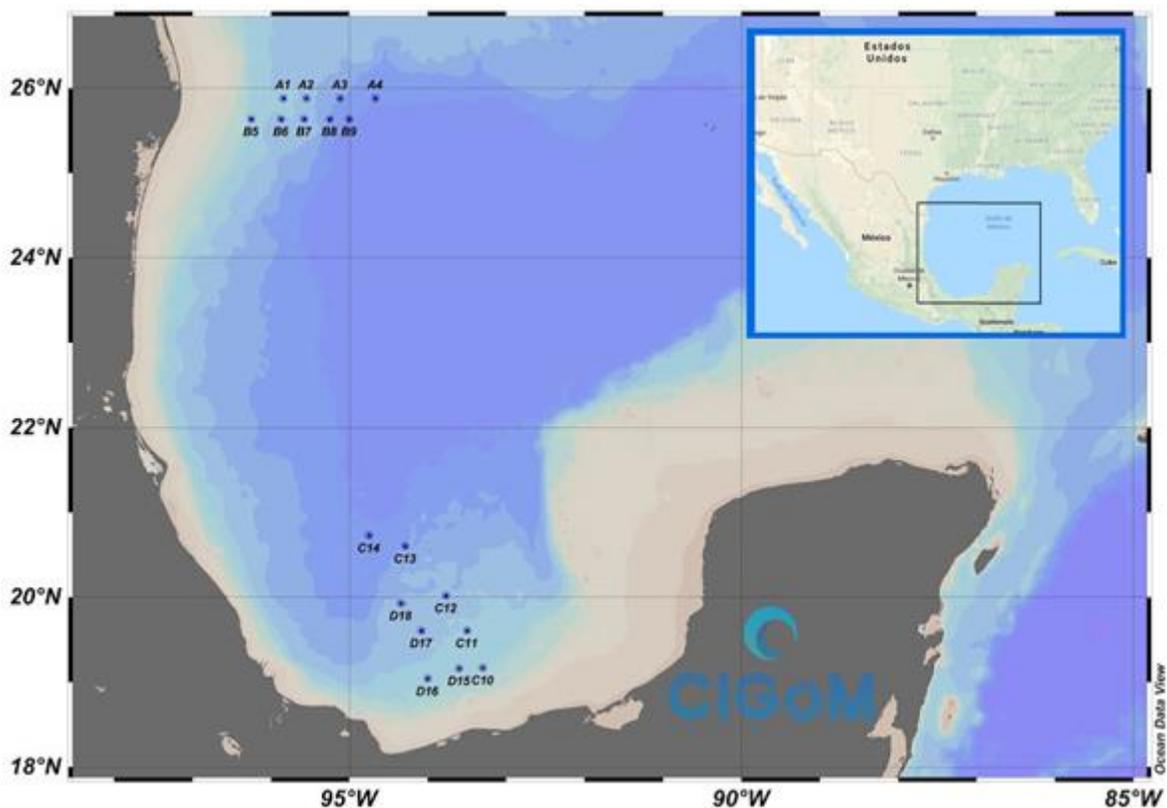


Fig.6.- Mapa del sitio de recolección de las cepas incluidas en el estudio.

En la tabla 2 se muestra el nombre del sitio y la profundidad a la que fueron recolectadas las cepas bacterianas, las cuales podemos ubicar en el mapa de la figura 4.

Tabla 2.- Sitio y profundidad, donde se recolectaron los aislados incluidos en el estudio.

| Cepa | Sitio | Profundidad (m) |
|------------------------------------|-------|-----------------|
| <i>Pseudoalteromonas sp</i> (A2MO) | A2 | 356 |
| <i>Shewanella sp</i> (A4F) | A4 | 2946 |
| <i>Enterobacter sp</i> (A3MO) | C11 | 48 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | C14 | 82 |
| <i>Thalassospira sp</i> (B6F) | B6 | 998 |
| <i>Citrobacter sp</i> (C13MF) | C13 | 65 |
| <i>Micrococcus luteus</i> (C14MF) | C14 | 82 |
| <i>Erwinia sp</i> (C14MF) | C14 | 82 |
| <i>Vibrio sp</i> | C12 | 1329 |
| <i>Bacillus cereus</i> (C14MF) | C14 | 82 |
| <i>Microbacterium sp</i> (C14MF) | C14 | 82 |
| <i>Idiomarina sp</i> (B7H2) | B7 | 1210 |

Algunos trabajos previos con estas cepas fueron realizados en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental del CEIB. En la tabla 3 se presenta información relevante de estas cepas que permitieron su elección para realizar el presente trabajo de investigación.

Tabla 3.- Bacterias con capacidad para degradar diferentes tipos de HCs

| Género | HCs que utiliza | Biodegradación (%) | Medio de cultivo para su selección | Referencia |
|------------------------------|--|---|------------------------------------|--|
| <i>Citrobacter sp.</i> | Diesel | 60,14 ± 0,7% | Medio líquido suplementado con Fe | (Venkidusamy <i>et al.</i> , 2018) |
| <i>Enterobacter sp.</i> | Presencia de genes <i>alkAB</i> que están relacionados con la degradación de alcanos | - | Caldo de tripticasa de soja | (Curiel-Maciél <i>et al.</i> , 2020). |
| <i>Shewanella sp.</i> | Petróleo crudo e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) | Petróleo crudo 47.24 % , FLN 68%, PHE 40% y PYR 39% | ONR7 y Medio MSB | (Bayat <i>et al.</i> , 2015) y (Ben Said <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>Idiomarina sp.</i> | n-alcanos e HAPs | 21.77 % | Medio marino mínimo | (Bahena., 2020). |
| <i>Pseudoalteromonas sp.</i> | Petróleo crudo | 27.13 % | Medio mínimo salino ONR7 | (Bayat, <i>et al.</i> 2015) |

| | | | | |
|---------------------------|---|-----------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| <i>Vibrio sp.</i> | Fenantreno, HAPs, naftaleno; bola de alquitrán asociada | - | - | (Chikere <i>et al.</i> , 2011) |
| <i>Thalassospira sp.</i> | Queroseno, aromina y petróleo crudo | 50 % | Medio marino mínimo | (Bertrand B. <i>et al.</i> , 2020). |
| <i>Bacillus subtilis.</i> | HAPs | 98 % FLN, 12% PHE y 40% PYR | Medio MSB | (Ben Said, <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>Micrococcus sp.</i> | Petróleo crudo | 66.08 % | Medio mínimo salino ONR7 | (Bayat <i>et al.</i> , 2015) |
| <i>Microbacterium sp.</i> | Fenantreno | - | - | (Chikere <i>et al.</i> , 2011) |
| <i>Erwinia sp</i> | Alcanos | - | - | (Chikere <i>et al.</i> , 2011) |

7.2.- Caracterización de las cepas

7.2.1.- Caracterización morfológica

Se realizó una caracterización morfológica de las cepas, para confirmar su morfología y pureza, por lo que las 12 cepas se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo marino (caldo de soya tripticaseina 30 g/L, dextrosa anhidra 2.5 g/L, extracto de carne 1.2 g/L, sulfato de amonio 1.2 g/L, cloruro de calcio 1.2 g/L, sal marina 10 g/L y agar bacteriológico 15 g/L) a temperatura ambiente, durante 48 horas, tomándose en cuenta los siguientes parámetros: forma de la colonia, bordes, elevación, color y consistencia.

7.2.2.- Tinción de Gram

Se utilizó la tinción de Gram para determinar si las bacterias eran Gram positivas o Gram negativas, y como parte de su caracterización. Se sembró cada cepa en medio marino y se dejaron crecer durante 24 horas a temperatura ambiente, posteriormente se tomó una colonia de cada cepa y se colocó en un portaobjetos fijándose con calor. La tinción se realizó siguiendo los siguientes pasos:

- 1.- Se cubrió cada muestra con cristal violeta durante 30 segundos y posteriormente se enjuagaron con agua destilada.
- 2.- Se agregó Lugol y se dejaron reposar durante 30 segundos, se enjuagaron con agua destilada.
- 3.- Se agregó alcohol cetona (70-30%) durante 30 segundos, posteriormente se enjuagaron con agua destilada.
- 4.- Se añadió safranina durante 30 segundos y se enjuagaron con agua destilada, inmediatamente se dejaron secar y una vez secas se observaron en el microscopio compuesto a un objetivo con ampliación de 100x.

7.3.- Degradación del petróleo crudo por cada cepa individual

Se realizaron ensayos de degradación a cada cepa de manera individual, para conocer sus capacidades degradativas. Para ello se utilizó un petróleo crudo maya con gravedad API de 22, libre de asfaltenos, a 100 partes por millón (ppm) en medio mínimo marino como única fuente de carbono. Los experimentos fueron realizados por triplicado en matraces de 50 ml, a un volumen de 20 ml, temperatura de 15 °C, salinidad de 12.29 g/L y se incubaron durante 12 y 30 días para tener un tiempo mínimo y un máximo.

7.4.- Índice de emulsión (IE₂₄) por las cepas individuales

Una emulsión es una mezcla homogénea de dos líquidos inmiscibles entre sí, un bioemulsificante estabiliza esta reacción. La emulsión se determinó al terminar los tiempos de incubación de los ensayos de degradación de cada cepa. Se calculó el IE₂₄ mediante el protocolo de Cooper y Goldenberg, el cual consiste en la adición de queroseno a un volumen de 6 ml con 4 ml caldo de cultivo libre de células. Después de mezclar con vórtex durante 2 min y dejar reposar durante 24 h, el índice IE₂₄ se da como porcentaje de la altura de la capa emulsionada (en milímetros) dividido por la altura total de la columna de líquido (en milímetros).

7.5.- Tensión superficial por las cepas individuales

Se midió la tensión superficial (TS) con un tensiómetro Krüss (modelo K20S), se tomó 4 ml de cultivo libre de células y se colocó en un visel de vidrio, se tomó como control el medio de cultivo y se midió la tensión superficial en dinas /cm. (Tuleva B., *et al.*, 2005). Para medir los valores de la TS se tomó en cuenta el valor mínimo reportado en la literatura, el cual es de 28 mN/m (100%) que se podía alcanzar para la producción de un biosurfactante (BS) (Morales-Guzman, *et. al.*, 2021)

7.6.- Extracción del hidrocarburo

Se realizó la extracción del petróleo de los ensayos de degradación, con dos volúmenes iguales de DCM (10 ml) y colocando la mezcla en tubos de centrifuga de 50 ml, se agitó en un vortex hasta quedar homogéneo, posteriormente se centrifugó a 2000 RPM durante 15 minutos a 15 °C, se evaporó el disolvente (DCM) en un evaporador rotatorio (Büchi). Una vez que se tuvieron concentrados los extractos, se transfirieron a viales de 2 ml para posteriormente realizarse la cuantificación por peso del hidrocarburo degradado.

7.7.- Análisis cromatográfico

Se inyectó 1 µL de la muestra resuspendida en DCM y se analizó en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard Mod. HP-5890 equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar de caucho de HP-metil-silicón (25,5 m de largo x 0,32 mm de diámetro interior). La inyección se realizó con un split 1:10. Se utilizará helio como gas portador con un flujo de 29 ml min⁻¹. El inyector se mantuvo a una temperatura de 270 ° C. La temperatura inicial fue de 90 ° C con un gradiente inicial de 2 ° C min⁻¹ hasta 150 ° C, y un segundo gradiente de 10 ° C min⁻¹ de 150 ° C a 280 ° C. La temperatura del detector fue de 300 ° C.

7.8.- Cinéticas de crecimiento

Se realizaron cinéticas de crecimiento a cada una de las cepas, para cuantificar la biomasa en peso seco en su fase exponencial, ya que en esta fase se observa un crecimiento constante en la población celular, por lo tanto, es el momento óptimo para tomar la muestra de cada una de las cepas (Orozco M. y Solarte J., 2003), esto con el fin de determinar la proporción que se adicionará de cada una de ellas a los consorcios bacterianos para los ensayos de degradación.

Para ello se inoculó cada una de las cepas a una densidad óptica (DO) inicial de 0.1 en matraces de 250 ml a un volumen de 100 ml en medio de cultivo marino antes mencionado, fueron incubadas a 150 rpm, a una temperatura de 15°C, durante 48 horas. Se tomaron muestras cada 6 horas para determinar el crecimiento de cada cepa. Se cuantificó el peso seco de la biomasa y la DO y se estableció una curva de calibración para cada una de ellas. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. También se determinó la velocidad máxima de crecimiento y el tiempo de duplicación de cada una de las cepas. Estos valores se calcularon a partir de la regresión lineal de los datos obtenidos del peso seco y la DO de cada una de las cepas.

7.9.- Diseño de los consorcios bacterianos

Se eligió un diseño experimental que mejor se adapta al diseño de mezclas, mediante el software Design-Expert versión 7.0.0, este fue el diseño *simplex reticular (simplex-lattice) aumentado*, el cual consiste en tener q componentes o ingredientes (en este caso cada una de las cepas, será un componente), la combinación o mezcla de dichos componentes se define como tratamiento y se denotan por x_1, x_2, \dots, x_q . Deben satisfacerse dos restricciones a la hora de definir las proporciones en las que participan cada uno de los componentes de la mezcla:

$$0 \leq x_i \leq 1, \text{ para cada componente } i$$
$$\sum_{i=1}^q x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1$$

Estas restricciones son las siguientes:

- 1.- Las proporciones tienen que ser cantidades entre cero y uno
- 2.- Las q proporciones deben sumar siempre la unidad, esto causa que los niveles de los componentes x_1 no sean independientes entre sí, ya que, si aumentamos la proporción de un componente, se reducirá la proporción de los demás componentes.

La unidad de cada una de las mezclas fue la concentración de la biomasa inicial, la cual fue de 0.26 g/L.

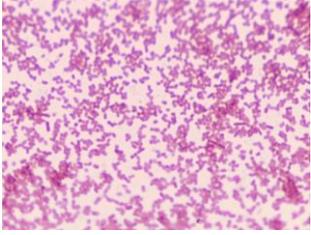
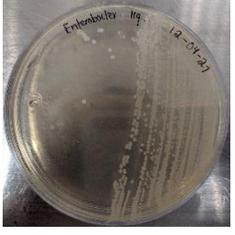
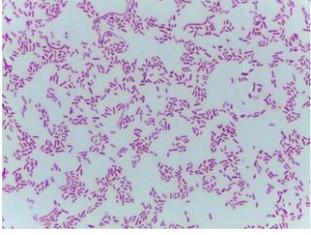
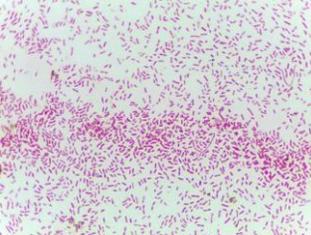
8.- Resultados y discusión

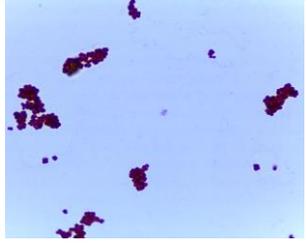
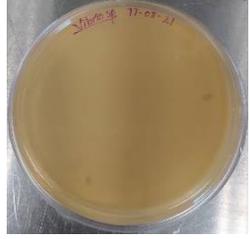
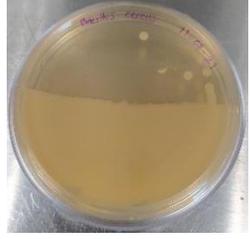
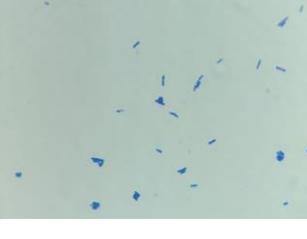
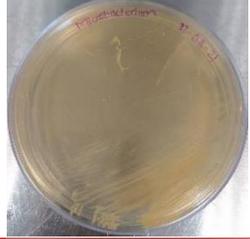
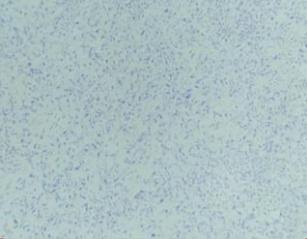
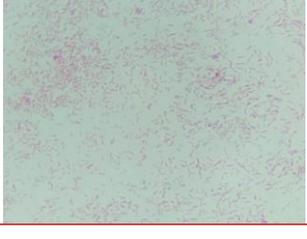
8.1.- Caracterización morfológica y tinción de Gram

Las 12 cepas se mostraron puras y tenían las características mostradas en la tabla 4. La tinción de Gram de las 12 cepas y la morfología en microscopio y en caja, coincide con lo reportado en la literatura, los aislados pertenecientes a las Gammaproteobacterias y que, a su vez, son Gram negativas son: *Citrobacter sp*, *Enterobacter sp*, *Erwinia sp*, *Vibrio sp*, *Shewanella sp*, *Thalassospira sp*, *Idiomarina sp*, y *Pseudoalteromonas sp*. (Morales-Guzmán *et. al.*, 2021; Ivanova *et al.*, 2004; Werkman y Gillen, 1932; Breed R., *et. al.*, 1957)

Por otro lado las bacterias aisladas Gram positivas, fueron *Bacillus subtilis* la cual es un bacilo formadora de esporas, perteneciente a la clase *Bacilli* y a la familia *Bacillaceae* (Madigan y Martinko., 2006) y *Micrococcus luteus* (Morales-Guzmán *et. al.*, 2021).

Tabla 4.- Caracterización morfológica y tinción de Gram de las cepas seleccionadas.

| Nombre de la cepa | Características | | | | |
|--------------------------|---|---|------------------------------|--|-----------------|
| | Morfología en caja | Tinción al microscopio | Color y tamaño de la colonia | Forma, borde y elevación de la colonia | Tinción de Gram |
| <i>Shewanella sp</i> |  |  | Blanca, mediana | Circular, completo, plana | Gram - |
| <i>Enterobacter sp</i> |  |  | Blanca, mediana | Circular, completo, plana | Gram - |
| <i>Bacillus subtilis</i> |  |  | Amarilla, mediana | Circular, completo y elevada | Gram + |
| <i>Citrobacter sp</i> |  |  | Blanca, mediana | Circular, completo, plana | Gram - |

| | | | | | |
|---------------------------|---|---|-------------------------------|---|--------|
| <i>Micrococcus luteus</i> |  |  | Amarilla, pequeña | Circular, completo, plana | Gram + |
| <i>Vibrio sp</i> |  |  | Blanca, efecto swarming | No tiene forma ni borde, plana (presenta efecto swarming) | Gram - |
| <i>Bacillus cereus</i> |  |  | Blanca, mediana | Circular, completo, plana | Gram + |
| <i>Microbacterium sp</i> |  |  | Blanca, pequeña | Circular, completo, plana | Gram + |
| <i>Idiomarina sp</i> |  |  | Blanca, mediana | Circular, completo, plana | Gram - |

8.2. Degradación de petróleo crudo por cada cepa individual

Se evaluó el porcentaje de degradación de las 12 cepas antes mencionadas, utilizando como única fuente de carbono, el petróleo crudo a 100 ppm. Los ensayos de biodegradación fueron en un máximo de 30 días y un mínimo de 12 días respectivamente, el tiempo de degradación fue dependiente del tiempo de crecimiento de cada bacteria y de sus capacidades metabólicas. Al mismo tiempo que se evaluó el porcentaje de degradación, se determinó la actividad biotensoactiva (tensión superficial) por sus siglas TS y bioemulsificante, IE₂₄ (índice de emulsión).

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en porcentajes, para la degradación de HCs, la reducción de la tensión superficial y actividad bioemulsificante (IE₂₄).

Tabla 5.- Porcentaje de degradación, TS (mN/m) e IE₂₄ de las cepas a 30 días

| Cepa | Biodegradación (%) | TS (mN/m) (%) | IE ₂₄ (%) |
|-----------------------------|--------------------------|---------------|----------------------|
| <i>Pseudoalteromonas sp</i> | 17.47 ± 0.8 | 21.3 | 15 |
| <i>Shewanella sp</i> | <u>9.6 ± 0.4</u> | 10.3 | <u>20</u> |
| <i>Enterobacter sp</i> | 18.8 ± 1.2 | 21.3 | 2 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 25.73 ± 0.6 | 93.1 | 30 |
| <i>Thalassospira sp</i> | 17.4 ± 0.6 | 13.7 | <u>22</u> |
| <i>Citrobacter sp</i> | 11 ± 0.8 | 6.8 | 1 |
| <i>Micrococcus luteus</i> | 13 ± 0.6 | 0 | 1.5 |
| <i>Erwinia sp</i> | 10.8 ± 0.4 | 6.8 | 1 |
| <i>Vibrio sp</i> | 24.9 ± 0.8 | 41.3 | 2 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 22.6 ± 1 | 86.2 | <u>30</u> |
| <i>Microbacterium sp</i> | 12 ± 0.4 | 13.7 | 0.8 |
| <i>Idiomarina sp</i> | <u>40.1 ± 0.6</u> | 58.6 | 5 |

La cepa con mayor porcentaje de degradación en un periodo de 30 días de incubación fue *Idiomarina sp*, la cual tuvo un porcentaje del 40.1 % de degradación del petróleo crudo y eso lo podemos explicar ya que, esta cepa redujo la tensión superficial 58.6% lo que nos podría indicar la producción de un biosurfactante.

Por otro lado la cepa, *Bacillus subtilis* fue la segunda más alta en porcentaje de degradación, ya que esta degradó 25.73 % en un periodo de incubación de 30 días. Ashis y Naba en el 2012 demostraron que una cepa de *Bacillus subtilis* fue capaz de degradar benceno en un 82 % a los 90 días de incubación agregándole fosfato, nitrato y H₂O₂, lo que nos señala que posiblemente hubiéramos podido alcanzar un mayor porcentaje de degradación si la incubación con dichos HCs fuese de mayor tiempo.

Con respecto a la reducción de la tensión superficial, *Bacillus subtilis* fue la cepa que tuvo el porcentaje más alto, llegando casi al 100 % con valores de 31.3 ± 2.66 mN/m, tomando en cuenta que el valor mínimo reportado es de 28 mN/m (100%), así mismo su IE₂₄ fue de 30% lo que nos podría indicar la producción de un biosurfactante. Sharma y Pandey (2020) reportan la producción de un biosurfactante de tipo lipopéptido en una cepa de *Bacillus subtilis* que podría tratarse de surfactina, ya que este biosurfactante es producido por bacterias del género *Bacillus* (Wellen, 2014).

Según la literatura, en estudios realizados por Haba *et al.*, en el 2000 y Vilela *et al.*, en el 2014 un buen agente tensioactivo debería reducir la tensión superficial e interfacial a valores de 40,0 mN/m, eso nos dice que nuestra cepa produce un buen BS.

Bacillus cereus redujo la TS en menor proporción (36.8.mN/m) lo que equivale al 86.2 %, esto también nos podría indicar que esta cepa está produciendo un BS. Diversos autores destacan que varios géneros bacterianos, incluidos *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*, son capaces de producir BS (Ranasalva *et al.*, 2014; Ekprasert *et al.*, 2019).

En la tabla 6, la cual se muestra a continuación, podemos observar los porcentajes de degradación de cada una de las cepas, junto con el porcentaje de reducción de

la TS e IE₂₄. La comparación de los porcentajes de biodegradación de las cepas a los 12 y 30 días de incubación con petróleo crudo se presenta en la Tabla 6.

Tabla 6.- Comparación del porcentaje de degradación de las cepas a 12 y 30 días.

| Cepa | % de biodegradación | | Pr > t |
|-----------------------------|---------------------|-------------|---------------|
| | 12 días | 30 días | |
| <i>Pseudoalteromonas sp</i> | 14 ± 2 | 17.47 ± 0.8 | <u>0.064</u> |
| <i>Shewanella sp</i> | 6.7 ± 0.95 | 9.6 ± 0.4 | 0.0086 |
| <i>Enterobacter sp</i> | 16.2 ± 1 | 18.8 ± 1.2 | 0.0454 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 12.11 ± 0.5 | 25.73 ± 0.6 | <.0001 |
| <i>Thalassospira sp</i> | 11.45 ± 1 | 17.4 ± 0.6 | 0.001 |
| <i>Citrobacter sp</i> | 8.1 ± 1.6 | 11 ± 0.8 | 0.0419 |
| <i>Micrococcus</i> | 5.8 ± 0.9 | 13 ± 0.6 | 0.0003 |
| <i>Erwinia sp</i> | 6.1 ± 0.5 | 10.8 ± 0.4 | 0.0002 |
| <i>Vibrio sp</i> | 23.1 ± 0.98 | 24.9 ± 0.8 | <u>0.0699</u> |
| <i>Bacillus cereus</i> | 8.7 ± 0.5 | 22.6 ± 1 | <.0001 |
| <i>Microbacterium sp</i> | 8 ± 0.76 | 12 ± 0.4 | 0.0013 |
| <i>Idiomarina sp</i> | 37 ± 2.5 | 40.1 ± 0.6 | <u>0.0956</u> |

Si el valor de probabilidad (Pr) es <0.05 significa que la comparación del valor de las dos medias es significativamente diferente. Los valores subrayados nos muestran las cepas que no tuvieron una diferencia significativa en el porcentaje de degradación de 30 días con respecto a 12.

Para comparar los porcentajes de degradación de las cepas a los 12 y a los 30 días y saber si fueron significativos los porcentajes se realizó una prueba de *t* de Student, con un alfa de 0.05, en la tabla 6 podemos observar que no hubo una diferencia significativa en el aumento del porcentaje de degradación de las cepas *Pseudoalteromonas sp*, *Vibrio sp* e *Idiomarina sp* a los 30 días con respecto a 12 días de incubación con el petróleo crudo, ya que el valor de probabilidad (Pr) es

mayor que 0.05. Sin embargo, para las demás cepas si fue significativo el aumento de la degradación.

Pseudoalteromonas sp mostró porcentajes de degradación de 14 % a los 12 días, a los 30 días solo aumentó un 3 %, estudios anteriores revelan que algunas cepas de *Pseudoalteromonas sp* cuentan con el gene *alkB*, el cual es un gen que codifica para la enzima alcano 1-monooxigenasa, esta enzima cataliza la hidroxilación de alcanos (Zan, S. *et al.*, 2021). Por lo que esta cepa podría degradar alcanos, esto se puede observar en el análisis cromatográfico de la tabla 8 inciso B y C donde ya que se observa una disminución de los picos correspondientes a los HCs saturados, con respecto al control abiótico.

Microbacterium sp, mostró un porcentaje de degradación bajo, el cual fue de 8%, al aumentar el tiempo de exposición el porcentaje de degradación aumentó a 12%.

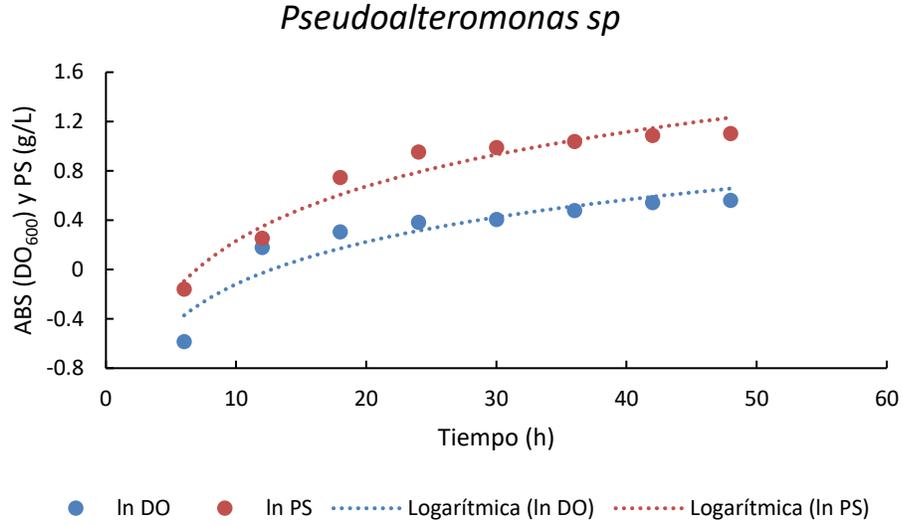
Se ha demostrado que *Bacillus subtilis* tiene la capacidad de degradar *n*-alcanos de cadena media y de cadena larga (C17–25), (Wang *et al.* 2019; Sakthipriya *et al.*, 2015), esto coincide con la degradación que observamos de esta cepa en el análisis cromatográfico (fig. 41), donde se muestra una disminución de los alcanos, podemos observar que a 12 días no se muestra una degradación significativa, sin embargo, a los 30 días ya se observa una disminución significativa del petróleo.

La cepa que tuvo un mayor porcentaje de degradación fue *Idiomarina sp*, esta cepa alcanzó niveles de degradación de 37 y 40% a 12 y 30 días, respectivamente.

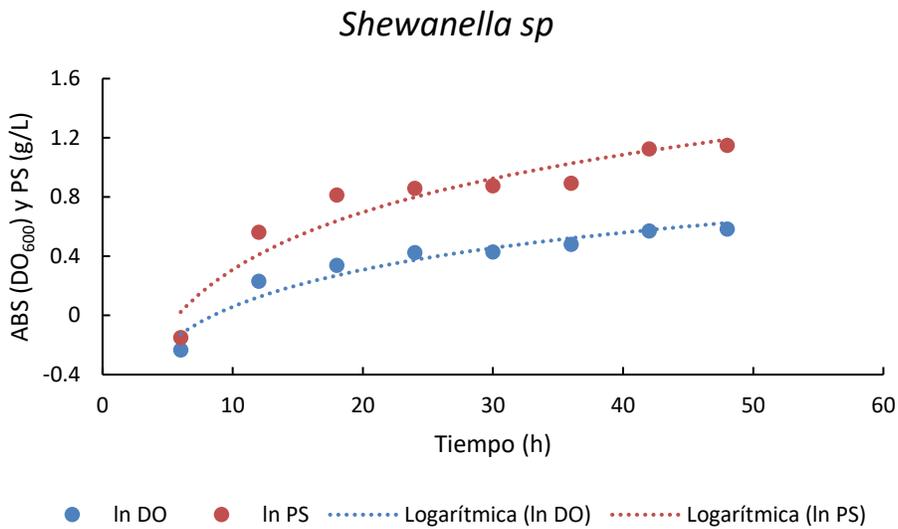
Malavenda *et al.*, en el 2015 aislaron 18 bacterias, entre ellas una *Idiomarina sp*. La cepa fue capaz de crecer en presencia de HCs y producir biosurfactantes con IE₂₄ de 50% y reducir la tensión superficial a valores inferiores a 30 mN/m. A diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, la cepa de *Idiomarina sp* evaluada en el presente estudio no mostró buenos resultados de reducción de la tensión superficial ni de índices de emulsión.

8.3.- Cinéticas de crecimiento bacteriano

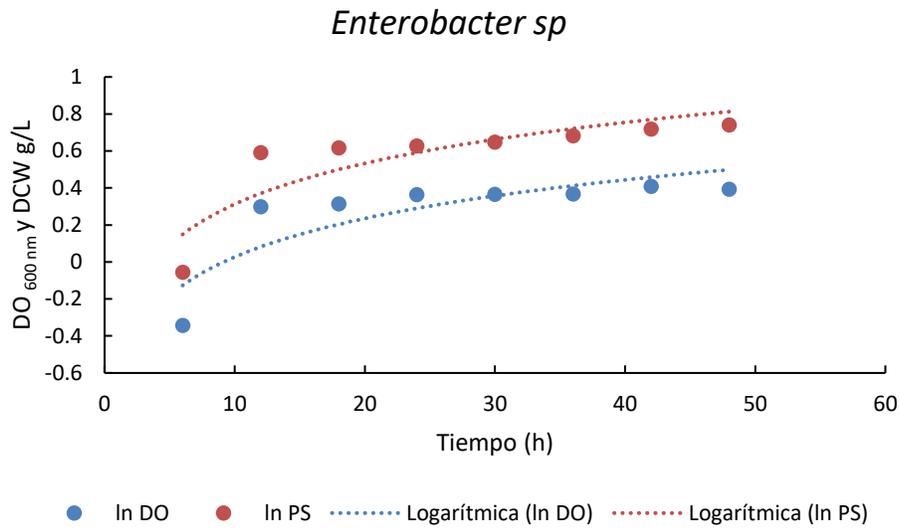
La muestra se tomó en la proporción que nos arrojó el diseño experimental “*Simplex lattice*”, así mismo se determinó la cinética de crecimiento de cada cepa (figuras 5-16)



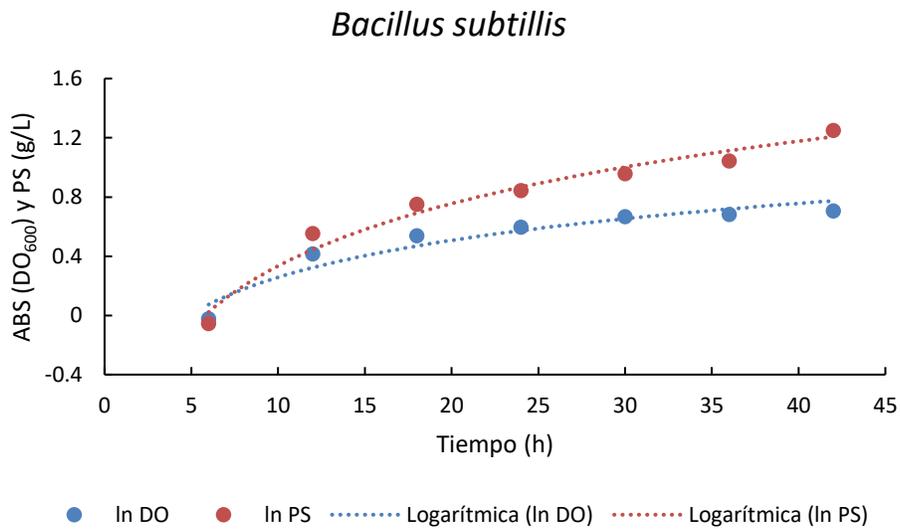
A) Cinética de crecimiento de la cepa *Pseudoalteromonas sp.*
(●) densidad óptica (600 nm) y (●) peso seco



B).- Cinética de crecimiento de la cepa *Shewanella sp.*
(●) densidad óptica (600 nm) y (●) peso seco

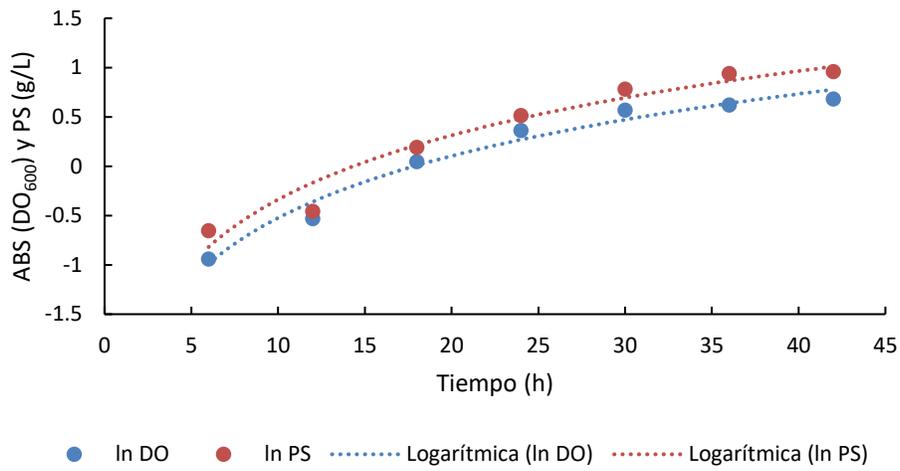


C) Cinética de crecimiento de la cepa *Enterobacter sp*.
 (●) densidad óptica (600 nm) y (●) peso seco



D) Cinética de crecimiento de la cepa *Bacillus subtilis*
 (●) densidad óptica (600 nm) y (●) peso seco

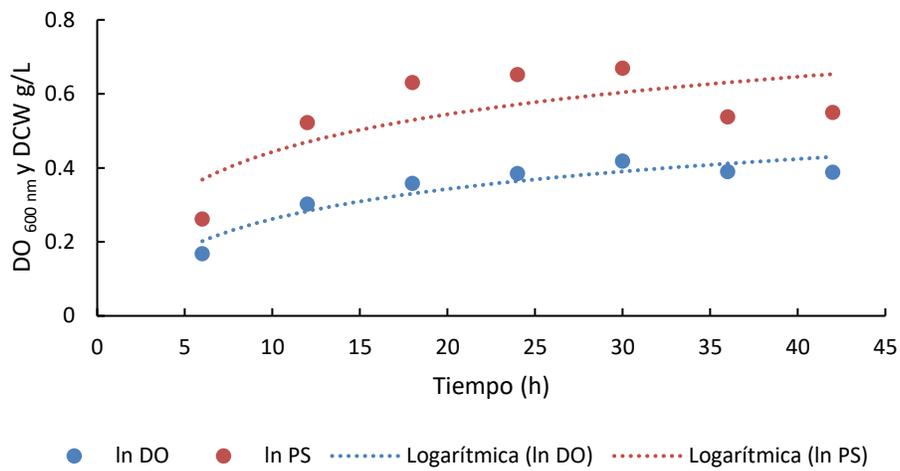
Thalassospira



E) Cinética de crecimiento de la cepa *Thalassospira*

(●) densidad óptica (600 nm) y (●) peso seco

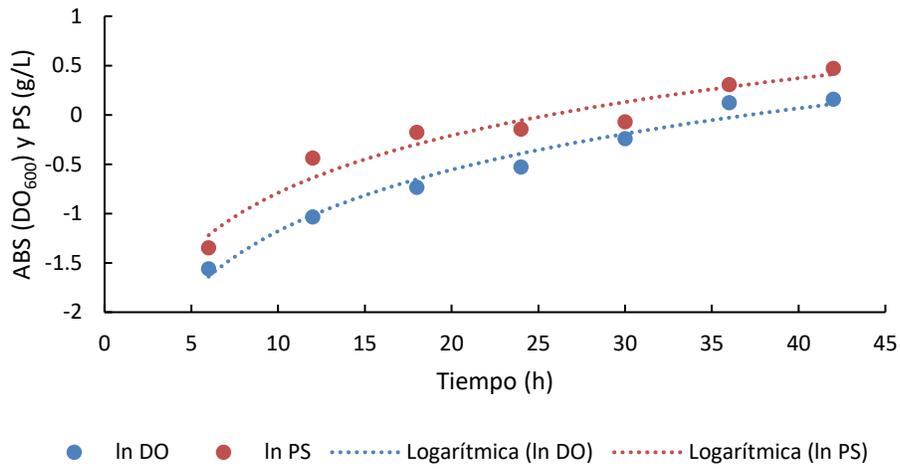
Citrobacter



F) Cinética de crecimiento de la cepa *Citrobacter*

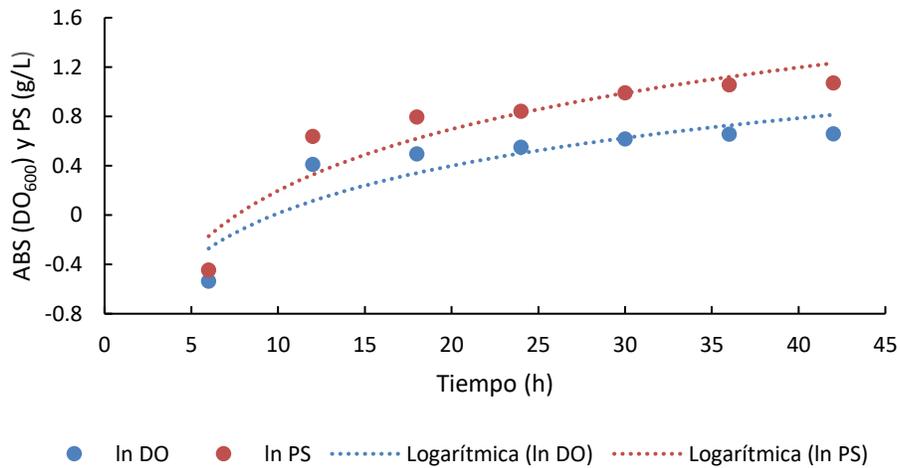
(●) densidad óptica (600 nm) y (●) peso seco

Micrococcus luteus

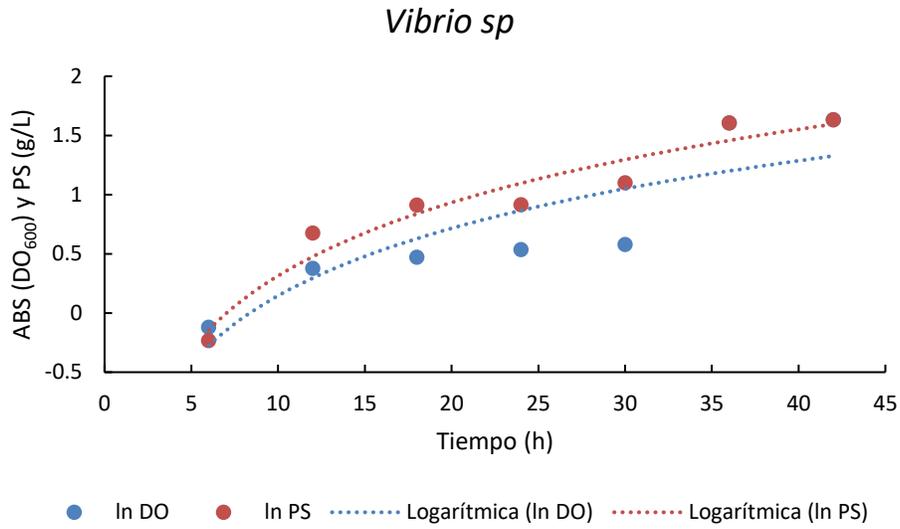


G) Cinética de crecimiento de la cepa *Micrococcus luteus*
(●) densidad óptica (600 nm) y (●) peso seco.

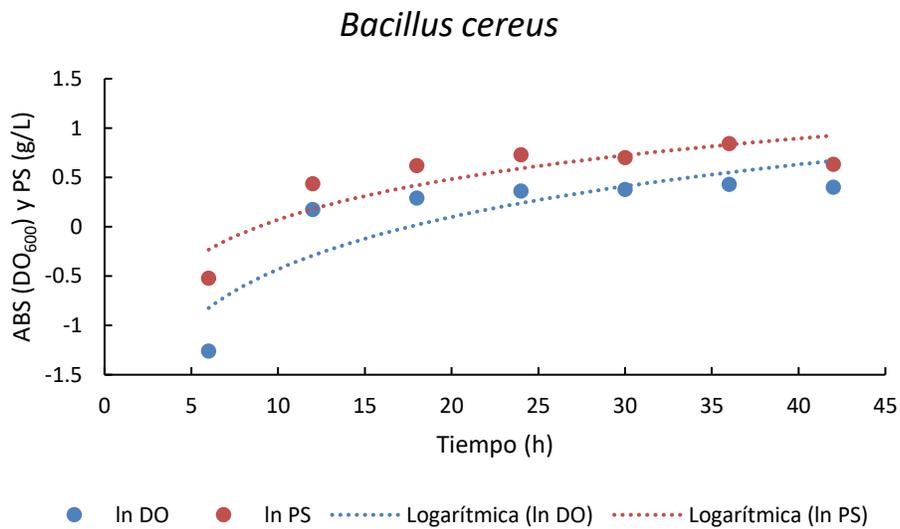
Erwinia sp



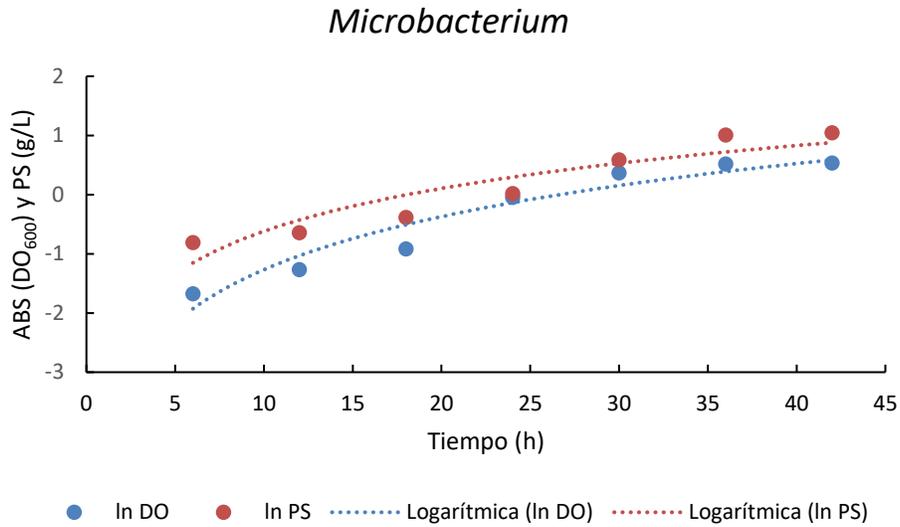
H) Cinética de crecimiento de la cepa *Erwinia sp*
(●) densidad óptica (600 nm) y (●) peso seco



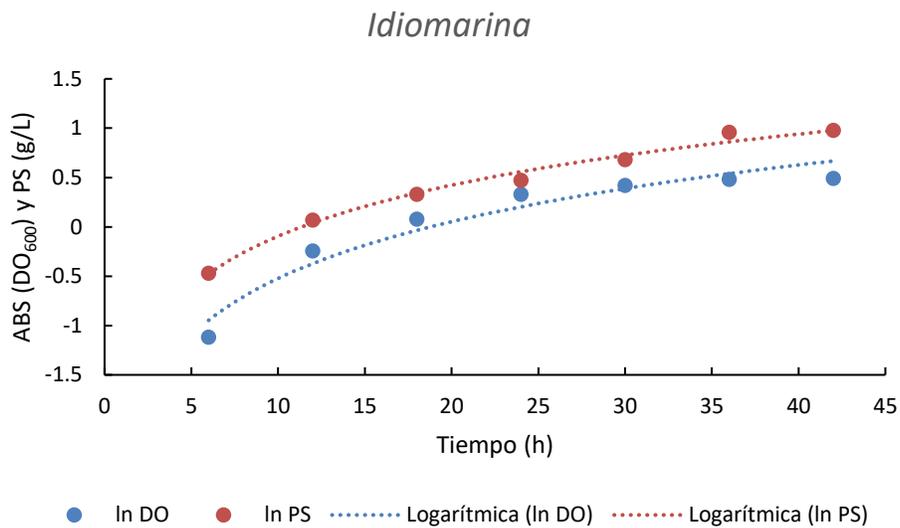
I) Cinética de crecimiento de la cepa *Vibrio sp*
 (●) densidad óptica (600 nm) y (●) peso seco



J) Cinética de crecimiento de la cepa *Bacillus cereus*
 (●) densidad óptica (600 nm) y (●) peso seco



K) Cinética de crecimiento de la cepa *Microbacterium*
 (●) densidad óptica (600 nm) y (●) peso seco



L) Cinética de crecimiento de la cepa *Idiomarina sp.*
 (●) densidad óptica (600 nm) y (●) peso seco

Figura 7.- Regresión lineal de las cinéticas de crecimientos de las 12 cepas individuales (incisos A-L)

Como podemos observar en las gráficas anteriores (Fig 7. Inciso A al L) el crecimiento exponencial de algunas cepas es diferente y de otras es igual, por

ejemplo el crecimiento exponencial de las cepas *Pseudoalteromonas sp*, *Shewanella sp*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter sp*, *Erwinia sp*, y *Vibrio sp.*, termina a las 18 horas mientras que el de *Enterobacter sp* termina a las 12 horas, el de *Thalassospira*, *Micrococcus*, *Microbacterium* e *Idiomarina sp*, termina a las 36 horas y el crecimiento exponencial de *Bacillus cereus* termina a las 24 horas, por lo que ese tiempo se tomó en cuenta para tomar la muestra y así iniciar con los ensayos de degradación, de los consorcios obtenidos por el programa estadístico, y con ello que todas las cepas inicien en su fase exponencial, con las misma cantidad celular. Como información importante del crecimiento de cada cepa se evaluó la velocidad máxima de crecimiento y el tiempo de duplicación (tabla 7).

Tabla 7.- Velocidad máxima de crecimiento (μ_{\max}) y tiempo de duplicación (t_d) de las cepas

| Cepa | μ_{\max} (h ⁻¹) | t_d (h) |
|--------------------------|---------------------------------|-----------|
| <i>Pseudoalteromonas</i> | 0.0748 | 9.272 |
| <i>Shewanella sp</i> | 0.0640 | 10.830 |
| <i>Enterobacter sp</i> | 0.1070 | 6.478 |
| <i>B. subtilis</i> | 0.0570 | 12.160 |
| <i>Thalassospira</i> | 0.0558 | 12.433 |
| <i>Citrobacter sp</i> | 0.0233 | 29.813 |
| <i>Micrococcus</i> | 0.0486 | 14.277 |
| <i>Erwinia sp</i> | 0.0947 | 7.323 |
| <i>Vibrio sp</i> | 0.0723 | 9.587 |
| <i>B. cereus</i> | 0.0744 | 9.323 |
| <i>Microbacterium</i> | 0.0713 | 9.728 |
| <i>Idiomarina sp</i> | 0.0461 | 15.036 |

8.4.- Diseño del consorcio bacteriano

Los resultados que obtuvimos gracias al diseño *simplex reticular (simplex-lattice) aumentado* fueron los siguientes: en total obtuvimos 12 mezclas, como se mencionó anteriormente este diseño consiste en tener q componentes, los cuales sus proporciones deben sumar la unidad, es decir uno. En este caso, cada mezcla está conformada por las 12 cepas, y una es mayoritaria, ya que la tenemos en una proporción del 50 %, es decir la mitad, el otro 50 % está conformado por las 11 cepas restantes, en una misma proporción, estas combinaciones son para saber si el crecimiento de cada una de las cepas tiene efecto sobre las demás y como afecta ello en la variable de respuesta (la degradación). A continuación, se muestran resultados de los tratamientos a 12 y 30 días de degradación (Tabla 8 y 9).

Tabla 8.- Diseño simplex reticular (simplex-lattice) aumentado, de 12 días de degradación.

| Block | Component 1 A:Pseudoalteromonas | Component 2 B:Shewanella | Component 3 C:Enterobacter | Component 4 D:B. subtilis | Component 5 E:Thalassospira | Component 6 F:Citrobacter | Component 7 G:Micrococcus | Component 8 H:Erwinia | Component 9 J:Vibrio | Component 10 K:B. cereus | Component 11 L:Microbacterium | Component 12 M:Idiomarina | Response 1 % degradación |
|---------|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Block 1 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 14 |
| Block 1 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 6.7 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 16.2 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 2.11 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 11.45 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 8.1 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 5.8 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 6.1 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 23.1 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 8.7 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 8 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 37 |
| Block 1 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 35.9 |
| Block 1 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 37.7 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 8.3 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 35.6 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 22 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 29.1 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 26.8 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 21.9 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 41.2 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 33.2 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 31.3 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 40.7 |

Tabla 9.- Diseño *simplex reticular (simplex-lattice) aumentado*, de 30 días de degradación.

| Block | Component 1 A:Pseudoalteromonas | Component 2 B:Shewanella | Component 3 C:Enterobacter | Component 4 D:B. subtilis | Component 5 E:Thalassospira | Component 6 F:Citrobacter | Component 7 G:Micrococcus | Component 8 H:Erwinia | Component 9 J:Vibrio | Component 10 K:B. cereus | Component 11 L:Microbacterium | Component 12 M:Idiomarina | Response 1 % degradación |
|---------|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Block 1 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 17.4 |
| Block 1 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 9.6 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 18.8 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 25.7 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 17.4 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 11 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 13 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 10.8 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 24.9 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 22.6 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 12 |
| Block 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 40.1 |
| Block 1 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 51 |
| Block 1 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 63.5 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 39 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 50 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 45.2 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 42.8 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 53.8 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 33.6 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 55.6 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 0.042 | 47.2 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 0.042 | 38.6 |
| Block 1 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.542 | 50.9 |

8.5.- Biodegradación de HCs por los consorcios bacterianos

Las mezclas que obtuvimos gracias al diseño *simplex reticular (simplex-lattice) aumentado* las sometimos a experimentos de degradación, con las mismas condiciones que para las cepas individuales (Medio ONR7, a 100 ppm de petróleo crudo) y los tiempos de incubación fueron de igual forma 12 y 30 días, los experimentos se realizaron por triplicado, y las proporciones de cada cepa, ya la conocemos gracias al diseño. A continuación, se muestra en la siguiente tabla los porcentajes de degradación por cada mezcla, así mismo, la actividad biotensoactiva (tensión superficial) y bioemulsificante (índice de emulsión).

Tabla 10.- Resultados obtenidos con respecto al porcentaje de degradación, TS (mN/m) e IE₂₄ de las mezclas a los 12 días.

| Mezcla (cepa mayoritaria) | % de biodegradación | TS (mN/m) | IE ₂₄ (%) |
|--|---------------------|-----------|----------------------|
| Mezcla 1 (<i>Pseudoalteromonas sp</i>) | 36 ± 0.4 | 0 | 2.2 |
| Mezcla 2 (<i>Shewanella sp</i>) | 37.7 ± 2.3 | 0 | 30 |
| Mezcla 3 (<i>Enterobacter sp</i>) | 8.3 ± 2.9 | 0 | 1.3 |
| Mezcla 4 (<i>Bacillus subtilis</i>) | 35.6 ± 0.12 | 0 | 2.9 |
| Mezcla 5 (<i>Thalassospira sp</i>) | 22 ± 1.3 | 0 | 13.4 |
| Mezcla 6 (<i>Citrobacter sp</i>) | 29.18 ± 2 | 0 | 2 |
| Mezcla 7 (<i>Micrococcus luteus</i>) | 26.8 ± 0.6 | 0 | 2.5 |
| Mezcla 8 (<i>Erwinia sp</i>) | 21.9 ± 0.6 | 0 | 27 |
| Mezcla 9 (<i>Vibrio sp</i>) | 41.2 ± 0.5 | 0 | 2 |
| Mezcla 10 (<i>Bacillus cereus</i>) | 33.2 ± 0.4 | 0 | 10 |
| Mezcla 11 (<i>Microbacterium sp</i>) | 31.3 ± 0.6 | 0 | 1 |
| Mezcla 12 (<i>Idiomarina sp</i>) | 40.7 ± 1.2 | 0 | 5 |

La mezcla con mayor porcentaje de degradación a los 12 días fue la mezcla 9, donde la cepa mayoritaria fue *Vibrio*, con un valor de 41.2%, sin embargo, esta mezcla no tuvo buen porcentaje de IE₂₄ y tampoco redujo significativamente la tensión superficial. La degradación podría estar dada por la actividad enzimática de alguna cepa. Ocurrió lo mismo para el caso de la mezcla 12, la cual tiene por cepa mayoritaria a *Idiomarina sp*, obtuvimos un porcentaje de degradación de 40.7%, pero el porcentaje IE₂₄ y de reducción de la TS fue muy bajo..

Un caso distinto fue con la mezcla 2 donde la cepa mayoritaria fue *Shewanella sp*, la cual degradó 37.7% del petróleo y tuvo un IE₂₄ de 30%, aunque no redujo la tensión superficial.

Tabla 11.- Porcentaje de degradación, TS (mN/m) e IE₂₄ de las mezclas a los 30 días.

| Mezcla (cepa mayoritaria) | % de biodegradación | TS (mN/m) | IE ₂₄ (%) |
|--|---------------------|-----------|----------------------|
| Mezcla 1 (<i>Pseudoalteromonas sp</i>) | 51 ± 0.8 | 0 | 2.9 |
| Mezcla 2 (<i>Shewanella sp</i>) | 63.5 ± 0.6 | 0 | 2.9 |
| Mezcla 3 (<i>Enterobacter sp</i>) | 39 ± 0.58 | 0 | 1 |
| Mezcla 4 (<i>Bacillus subtilis</i>) | 50 ± 0.5 | 0 | 2 |
| Mezcla 5 (<i>Thalassospira sp</i>) | 45.2 ± 1.1 | 0 | 12.5 |
| Mezcla 6 (<i>Citrobacter sp</i>) | 42.8 ± 0.4 | 0 | 2.6 |
| Mezcla 7 (<i>Micrococcus luteus</i>) | 53.87 ± 1 | 0 | 2.5 |
| Mezcla 8 (<i>Erwinia sp</i>) | 36.6 ± 0.4 | 0 | 2.8 |
| Mezcla 9 (<i>Vibrio sp</i>) | 55.6 ± 0.4 | 0 | 2.2 |
| Mezcla 10 (<i>Bacillus cereus</i>) | 47.2 ± 0.4 | 0 | 2.9 |
| Mezcla 11 (<i>Microbacterium sp</i>) | 38.6 ± 0.6 | 0 | 2.6 |
| Mezcla 12 (<i>Idiomarina sp</i>) | 51 ± 0.6 | 24.1 | 10 |

Como podemos observar en la tabla 10, el porcentaje de degradación de las mezclas aumentó significativamente en todos los tratamientos, lo que significa que las cepas requieren más tiempo de incubación para alcanzar un porcentaje de degradación mayor. La mezcla 3 fue la que incrementó más su porcentaje de degradación a los 30 días (30.7%), seguida de la mezcla 7, la mezcla 2 y la mezcla 5.

Tabla 12.- Comparación del porcentaje de biodegradación de las mezclas en un lapso de 12 y 30 días.

| Mezcla (cepa mayoritaria) | % de biodegradación | | Incremento % degradación | Pr > t |
|--|---------------------|-------------------|--------------------------|----------|
| | 12 días | 30 días | | |
| 1 (<i>Pseudoalteromonas sp</i>) | 36 ± 0.4 | 51 ± 0.8 | 15 | <0.001 |
| 2 (<i>Shewanella sp</i>) | 37.7 ± 2.3 | 63.5 ± 0.6 | <u>25.8</u> | <0.001 |
| 3 (<i>Enterobacter sp</i>) | 8.3 ± 2.9 | 39 ± 0.58 | <u>30.7</u> | <0.001 |
| 4 (<i>Bacillus subtilis</i>) | 35.6 ± 0.12 | 50 ± 0.5 | 14.4 | <0.001 |
| 5 (<i>Thalassospira sp</i>) | 22 ± 1.3 | 45.2 ± 1.1 | <u>23.2</u> | <0.001 |

| | | | | |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-----------|--------|
| 6 (<i>Citrobacter sp</i>) | 29.18 ± 2 | 42.8 ± 0.4 | 13.7 | 0.0003 |
| 7 (<i>Micrococcus luteus</i>) | 26.8 ± 0.6 | 53.87 ± 1 | <u>27</u> | <0.001 |
| 8 (<i>Erwinia sp</i>) | 21.9 ± 0.6 | 36.6 ± 0.4 | 14.7 | <0.001 |
| 9 (<i>Vibrio sp</i>) | 41.2 ± 0.5 | 55.6 ± 0.4 | 14.4 | <0.001 |
| 10 (<i>Bacillus cereus</i>) | 33.2 ± 0.4 | 47.2 ± 0.4 | 14 | <0.001 |
| 11 (<i>Microbacterium sp</i>) | 31.3 ± 0.6 | 38.6 ± 0.6 | 7.3 | 0.0001 |
| 12 (<i>Idiomarina sp</i>) | 40.7 ± 1.2 | 51 ± 0.6 | 10.3 | 0.0002 |

Si el valor de probabilidad (Pr) es <0.05 significa que la comparación del valor de las dos medias es significativamente diferente

Se observó que *Thalassospira sp* incrementa su porcentaje de degradación del petróleo crudo en presencia de otras 11 bacterias. Se sabe que *Thalassospira sp* está presente en consorcios aislados del Atlántico Medio y que son capaces de degradar fenantreno y pireno (Cui *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2009). Otros autores reportan que es capaz de degradar alcanos (40ará *et al.*, 2003 ; McKew *et al.*, 2007). Con respecto a *Bacillus subtilis* se observa que incrementa dos veces su porcentaje de degradación en presencia de las 11 cepas. No obstante, se observa una disminución de la actividad bioemulsificante (IE₂₄) y tampoco se observa una disminución de la tensión superficial, esto podría deberse a que otra cepa está inhibiendo la producción del biosurfactante. La mezcla que tuvo un mayor porcentaje de degradación fue la mezcla 2, alcanzando niveles de degradación de 37.7% y 63.5% a 12 y 30 días respectivamente, en esta mezcla la cepa de *Shewanella sp* donde esta cepa fue mayoritaria.

8.6 Comparación de la Biodegradación de HCs por cepas individuales y en consorcio

Se observó que todas las cepas presentaron biodegradación en la dicha fuente de carbono, los porcentajes de degradación aumentaron cuando las cepas se

encontraban en consorcio. A continuación, se muestran los resultados para cada una de las cepas evaluadas de manera individual y estando en consorcio.

1. *Pseudoalteromonas sp*

El porcentaje de degradación de *Pseudoalteromonas sp* por sí sola fue de 17.47% en un tiempo de incubación de 30 días, así mismo la reducción de la tensión superficial fue de 21.3% y el índice de emulsión de 15%. , mientras que la cepa estando en consorcio con las 11 cepas restantes y siendo ésta mayoritaria, aumentó la degradación a 51%, esta respuesta en el aumento de la degradación al estar en consorcio puede deberse a la buena sinergia con la que esta cepa trabaja con las demás cepas y a que posiblemente esta cepa siguió siendo mayoritaria al final del experimento, sin embargo, no hubo un buen resultado con respecto a la reducción de la TS ni al IE₂₄. En la literatura se ha demostrado que algunas cepas de *Pseudoalteromonas* si degradan HCs del petróleo, un estudio hecho por Bayat, *et al.*, en el 2015 demostraron que una cepa de *Pseudoalteromonas* (BHA8) degradó 27 % de petróleo crudo, y tuvo un IE₂₄ de 71 %.

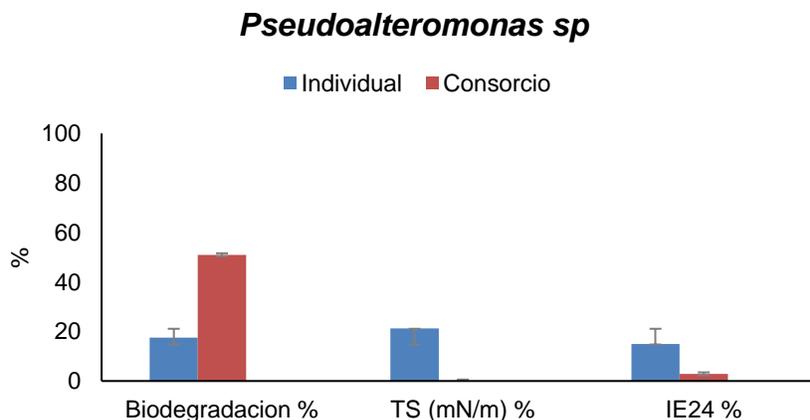


Fig. 8.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE₂₄ de la cepa *Pseudoalteromonas sp* individualmente y en consorcio.

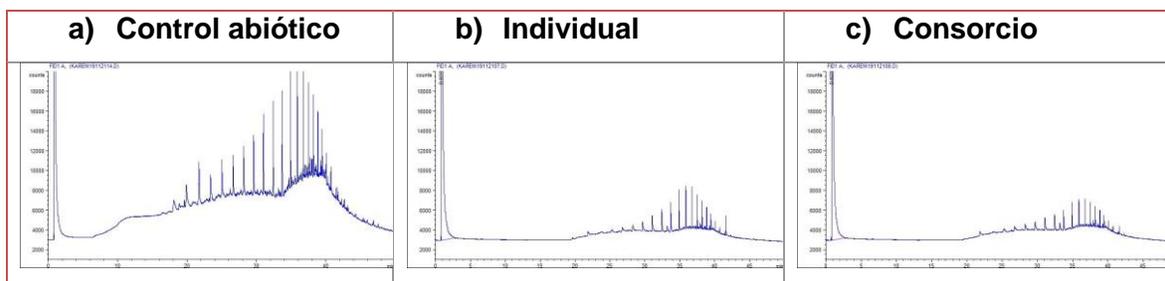


Fig. 9.- Comparación del perfil cromatográfico de *Pseudoalteromonas sp* individualmente y en consorcio.

En la figura 34 se muestra la comparación entre el control abiótico, la cepa individual y en consorcio, siendo muy notorio la disminución de los picos en el cromatograma.

2. *Shewanella sp*

Shewanella sp de manera individual degradó 9.6% de petróleo crudo, mientras que en consorcio siendo esta mayoritaria, degradó el 63.5%, lo que nos indica que esta cepa trabaja muy bien estando en consorcio, respecto a la disminución de la tensión superficial, se observa la disminución de la tensión superficial en un 10.3% por la cepa individual, esto nos indica que la bacteria puede estar produciendo algún biosurfactante en poca cantidad, no hay estudios donde se compruebe la producción de biosurfactantes en la cepa del género *Shewanella*, por lo que se debe investigar más a fondo que tipo de biosurfactante estará produciendo y en qué cantidades. Se puede observar que estando en consorcio no se observa disminución de la tensión superficial, lo que nos podría estar indicando que la producción del surfactante podría estar siendo inhibida por otras bacterias.

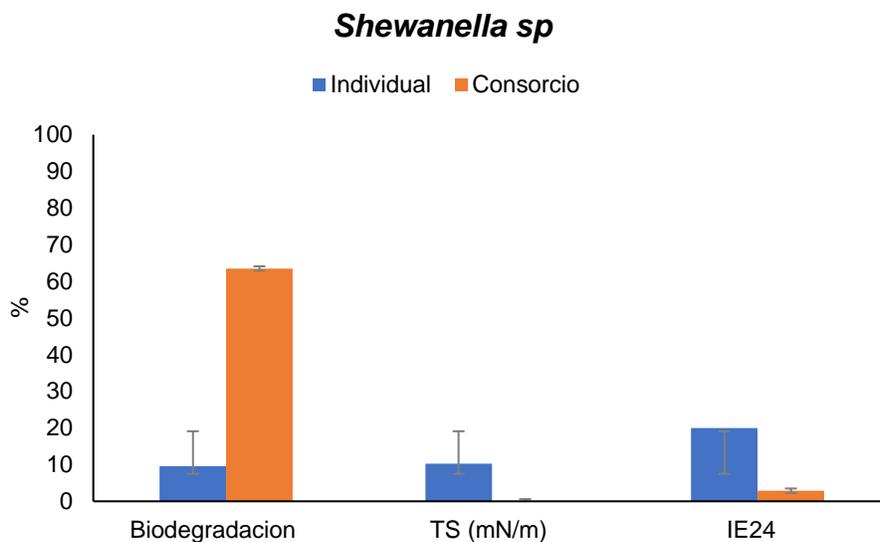


Fig. 10.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE₂₄ de la cepa *Shewanella sp* individualmente y en consorcio.

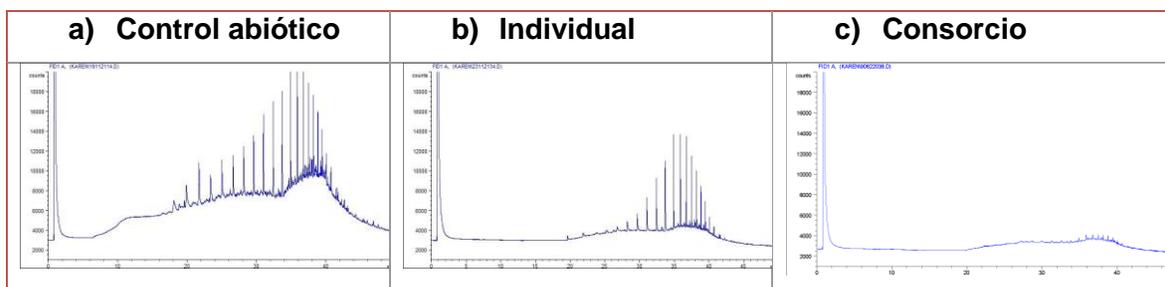


Fig. 11.- Comparación del perfil cromatográfico de *Shewanella sp* individualmente y en consorcio.

3.- *Enterobacter sp*

La cepa *Enterobacter sp* tuvo un porcentaje de degradación de 8% cuando se encontraba de manera individual, mientras que estando en consorcio, siendo esta mayoritaria el porcentaje de degradación aumentó a 39%. Respecto a la disminución de la tensión superficial la cepa disminuyó la tensión superficial en un 21.3%, por lo que tuvo un índice de emulsión del 8% y en consorcio no se observó dicha disminución ni tampoco índice de emulsión. Estudios anteriores han

encontrado que la cepa del género *Enterobacter* producía un biosurfactante que, mediante cromatografía de capa fina (TLC) concluyeron que se trataba de un glicolípido. Además, la cepa podía crecer en aceite de motor gastado y realizar una actividad de emulsificación relativamente mayor de BS en comparación con la mayoría de BS producidas por otras cepas de *Enterobacter* (Ekprasert *et.al.*, 2020).

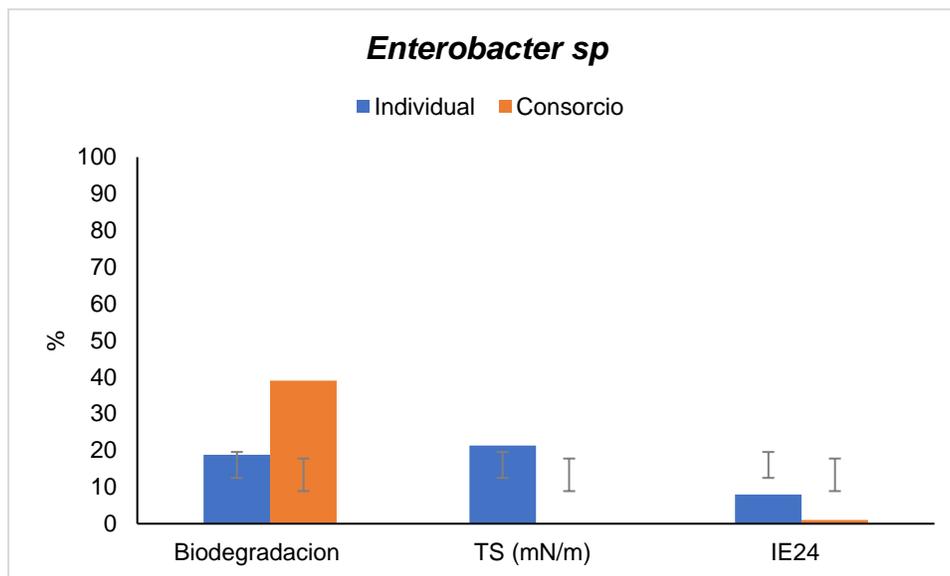


Fig. 12.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE₂₄ de la cepa *Enterobacter sp* individualmente y en consorcio.

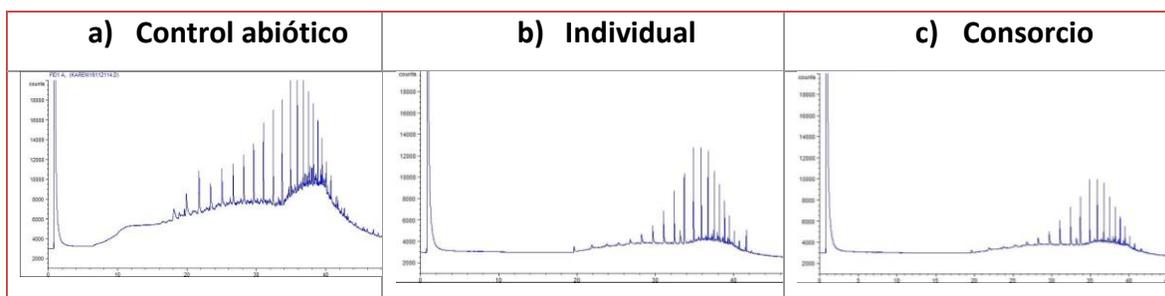


Fig. 13.- Comparación del perfil cromatográfico de *Enterobacter sp* individualmente y en consorcio.

4.- *Bacillus subtilis*

Esta cepa a los 30 días alcanzó valores de degradación de 25.73 %, también redujo la tensión superficial (TS) a 31.3 ± 2.66 mN/m y se obtuvo porcentaje de IE₂₄ de 41%, el cual fue el mayor, con respecto a las demás cepas.

Según la literatura, en estudios realizados por Haba et al., 2000 y Vilela et al., 2014 un buen agente tensioactivo debería reducir la tensión superficial e interfacial a valores de 40,0 mN/m, en este estudio los resultados obtenidos mostraron que las cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* lograron reducir la tensión superficial, *Bacillus subtilis* redujo la tensión superficial (TS) a 31.3 ± 2.66 mN/m, mientras que *Bacillus cereus* la redujo en mayor proporción (36.8.mN/m (tabla 9), lo que podría indicar la producción de un biosurfactante (BS). Diversos autores destacan que varias especies bacterianas, incluidas *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*, son capaces de producir BS (Ranasalva et al., 2014; Ekprasert et al., 2019). Sharma y Pandey, 2020 reportan la producción de un biosurfactante de tipo lipopeptido en *Bacillus subtilis*. Podría tratarse de surfactina, ya que este biosurfactante es producido por bacterias del género *Bacillus* (Wellen, 2014).

Ashis K. y Naba K. en el 2012 demostraron que una cepa de *Bacillus subtilis* fue capaz de degradar Benceno en un 82% a los 90 días de incubación agregándole Fosfato, Nitrato y H₂O₂, en el caso de nuestra cepa, logró degradar el 25.73% a los 30 días, lo que nos señala que posiblemente hubiéramos podido alcanzar un mayor porcentaje de degradación si la incubación con dichos HCs fuese de mayor tiempo. Eso no descarta que el aislamiento de *Bacillus subtilis* sea un potencial degradador de HCs. A su vez esta cepa, del estudio antes mencionado al estar en consorcio con otras cepas de *P. aeruginosa* degradó más porcentaje de hidrocarburo (88%).

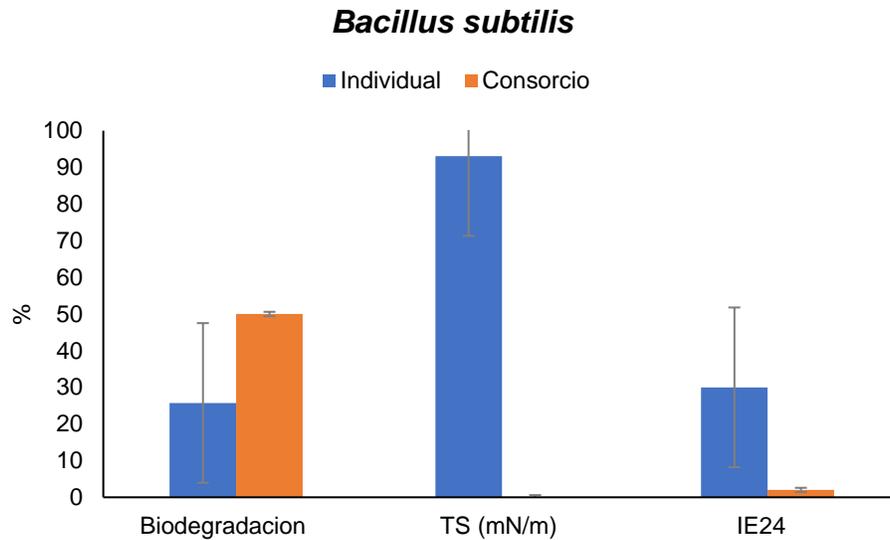


Fig. 14.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE₂₄ de la cepa *Bacillus subtilis*, individualmente y en consorcio.

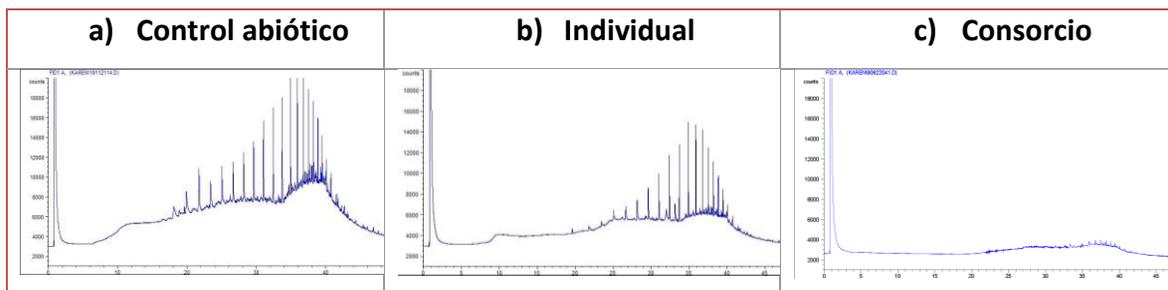


Fig. 15.- Comparación del perfil cromatográfico de *Enterobacter sp* individualmente y en consorcio.

5.- *Thalassospira sp*

La cepa *Thalassospira sp* tuvo una velocidad de crecimiento de 0.0558 h⁻¹, a las 6 horas de incubación alcanzó una DO de 0.39. esta cepa degradó 17.4 % a los 30 días de incubación. Sin embargo, cuando se incubó en consorcio con las demás cepas y fue mayoritaria, su porcentaje de degradación fue de 45.2 al mismo tiempo de incubación. Cui Z et al., en el 2008 aislaron dos consorcios de sedimentos a 3,542 m de profundidad en la Dorsal del Atlántico Medio, en uno de estos consorcios

el género *Thalassospira* fue uno de los más dominantes y un género potencial en la degradación de HCs Aromáticos policíclicos (HAP) y lograron degradar HAP de 2 a 4 anillos, lo que nos dice que esta bacteria posee la maquinaria enzimática para degradar HAP. Así mismo si logró reducir la tensión superficial en un 13.7 % y su índice de emulsión fue de 22%, sin embargo al estar en consorcio estos valores disminuyen.

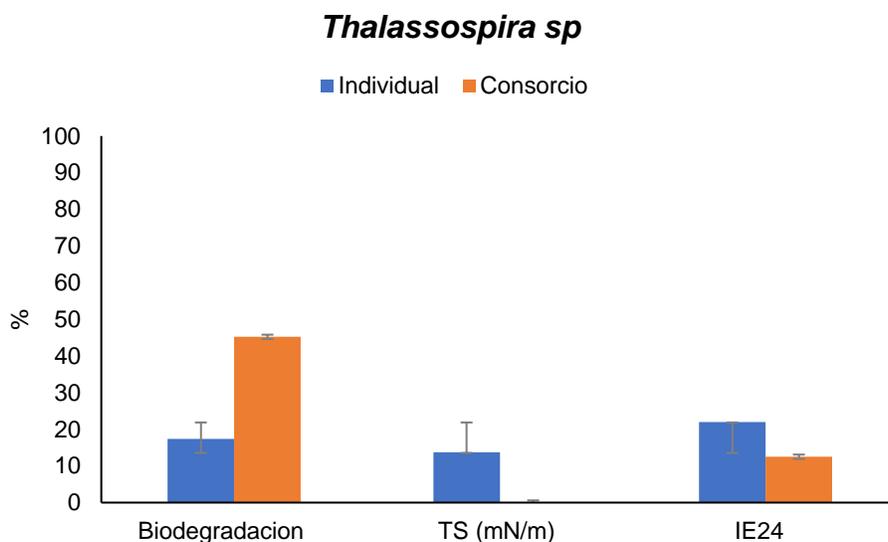


Fig. 16.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE₂₄ de la cepa *Thalassospira sp*, individualmente y en consorcio.

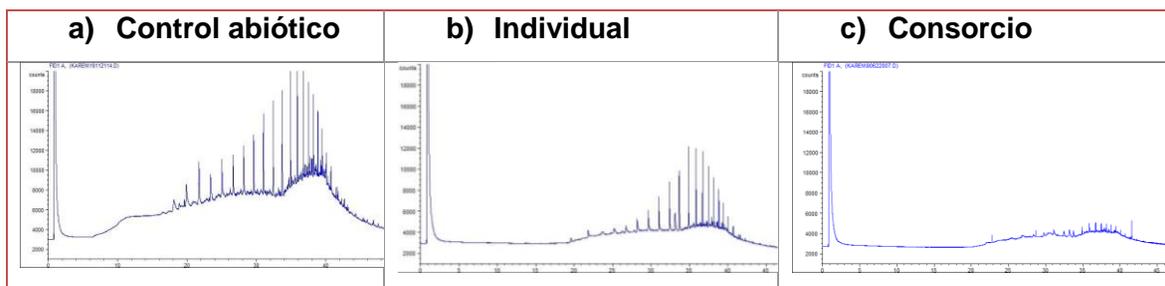


Fig. 17.- Comparación del perfil cromatográfico de *Thalassospira sp* individualmente y en consorcio.

6.- *Citrobacter sp*

La degradación aumenta considerablemente al estar en consorcio, como se puede apreciar en la figura

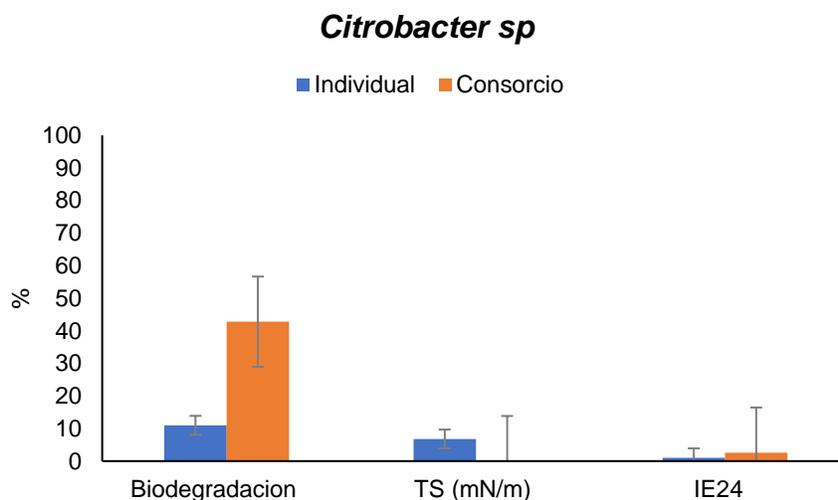


Fig. 18.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE₂₄ de la cepa *Citrobacter sp*, individualmente y en consorcio.

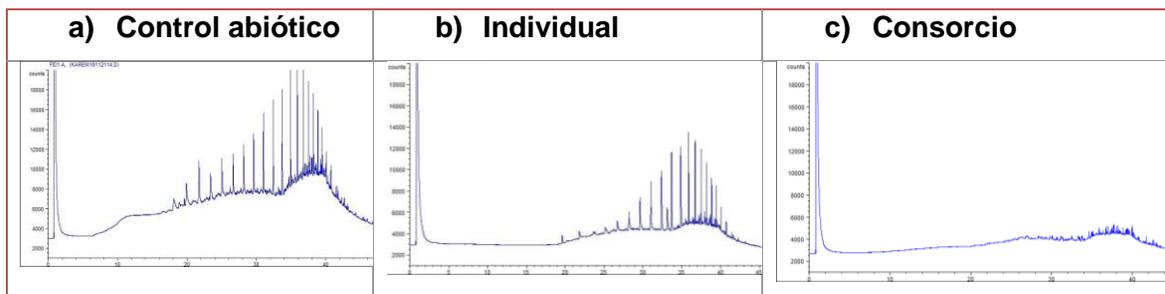


Fig. 19.- Comparación del perfil cromatográfico de *Citrobacter sp* individualmente y en consorcio.

7.- *Micrococcus luteus*

La cepa *Micrococcus luteus* degradó sólo el 13% de petróleo crudo en 4 semanas, se ha reportado que cepas de *Micrococcus luteus* a una concentración de 3.2×10^8

ml⁻¹ de células, pueden degradar hasta el 75% de gasolina en muestras de suelo contaminado dejándolas 8 semanas en incubación, podríamos concluir que el bajo porcentaje de degradación de nuestra cepa es debido al poco tiempo de incubación que se dejó con el petróleo, si se dejara más tiempo podría degradarse un mayor porcentaje.

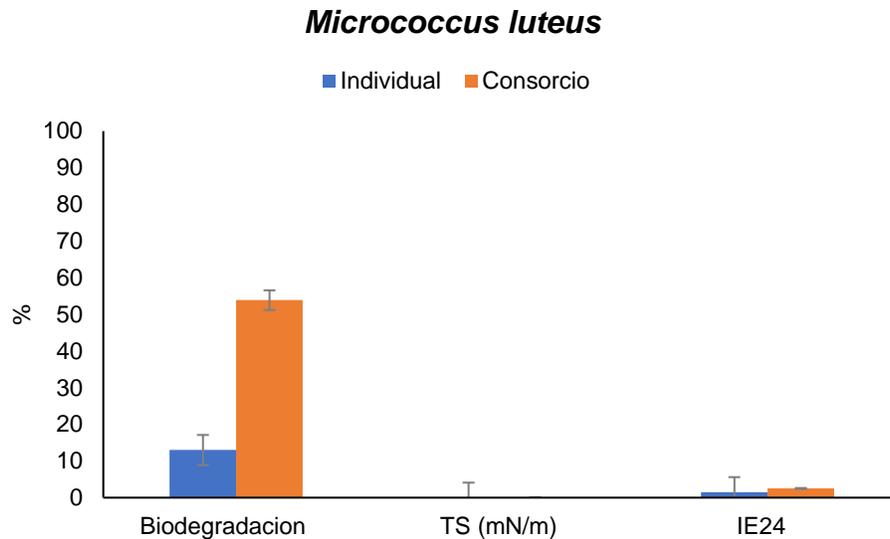


Fig. 20.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE₂₄ de la cepa *Micrococcus luteus*, individualmente y en consorcio.

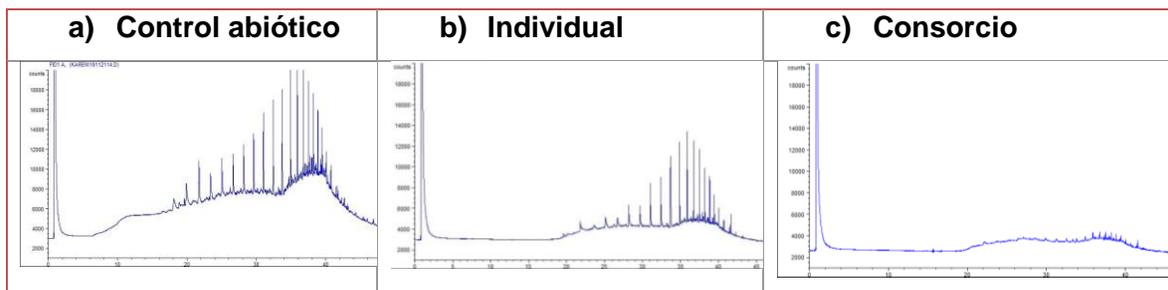


Fig. 21.- Comparación del perfil cromatográfico de *Micrococcus luteus* individualmente y en consorcio.

8.- *Erwinia sp*

La cepa *Erwinia sp* a los 30 días degradó únicamente el 10.8% de petróleo crudo, estudios anteriores han reportado para este género la capacidad para degradar alcanos, gracias a la presencia de Alcano hidroxilasas, genes importantes en la degradación de dichos HCs. Esta cepa alcanzó valores arriba del 50% en la reducción de la tensión superficial, sin embargo, no alcanzó niveles altos de degradación, como puede verse en la siguiente imagen

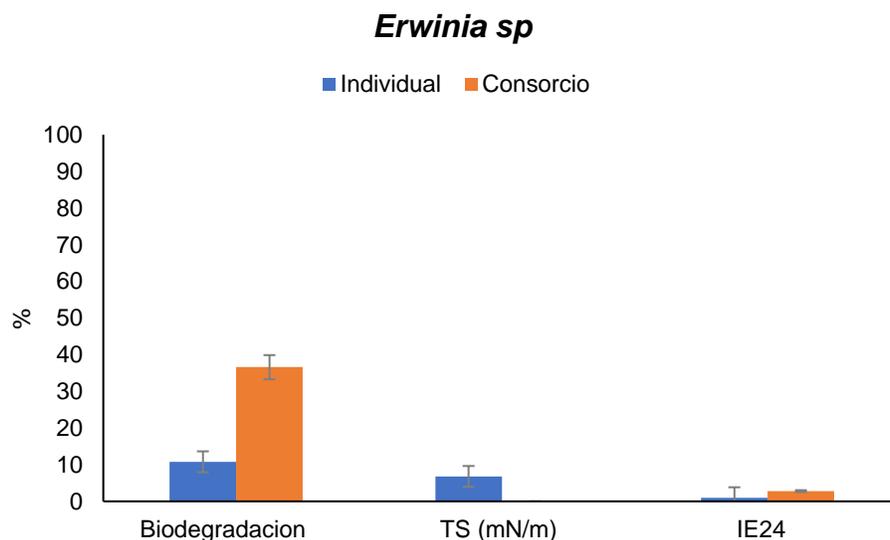


Fig. 22.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE₂₄ de la cepa *Erwinia sp*, individualmente y en consorcio.

| | | |
|---------------------|---------------|--------------|
| a) Control abiótico | b) Individual | c) Consorcio |
|---------------------|---------------|--------------|

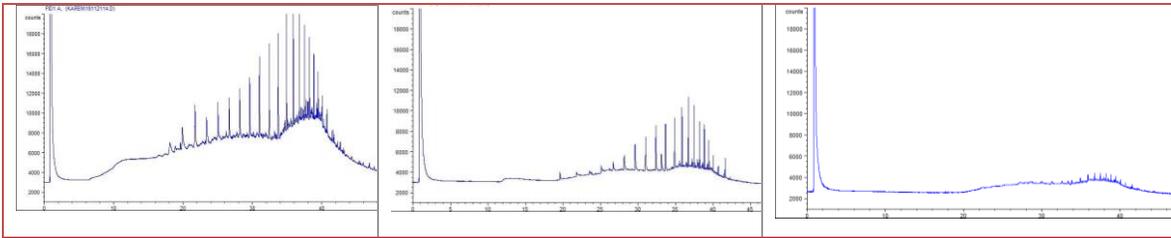


Fig. 23.- Comparación del perfil cromatográfico *Erwinia sp* individualmente y en consorcio.

9.- *Vibrio sp*

La cepa *Vibrio sp* a los 12 días degradó 23.1 % de petróleo crudo y a los 30 días sólo aumentó un poco el porcentaje a 24.9 %, varios autores han reportado para la familia *Vibrionaceae* que son capaces de degradar HAP, específicamente fenantreno West *et al.* , 1984

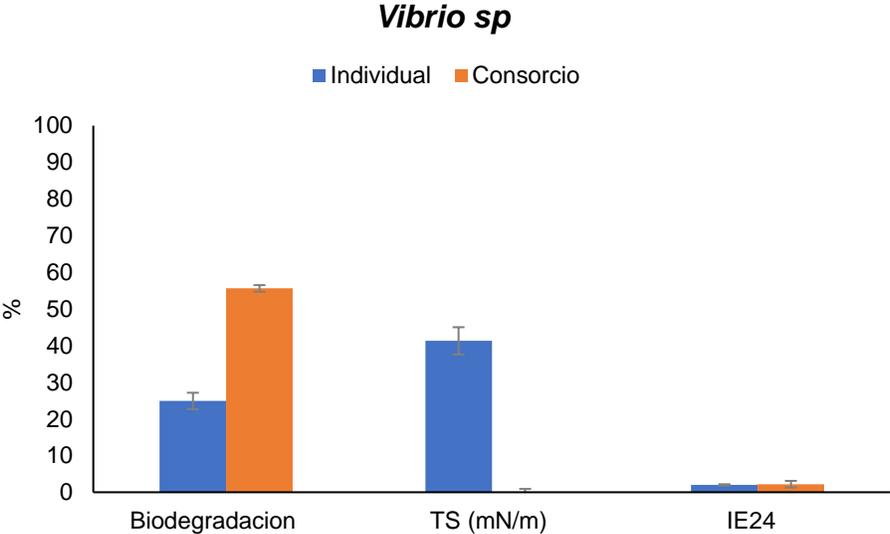


Fig. 24.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE₂₄ de la cepa *Vibrio sp*, individualmente y en consorcio.

| | | |
|---------------------|---------------|--------------|
| a) Control abiótico | b) Individual | c) Consorcio |
|---------------------|---------------|--------------|

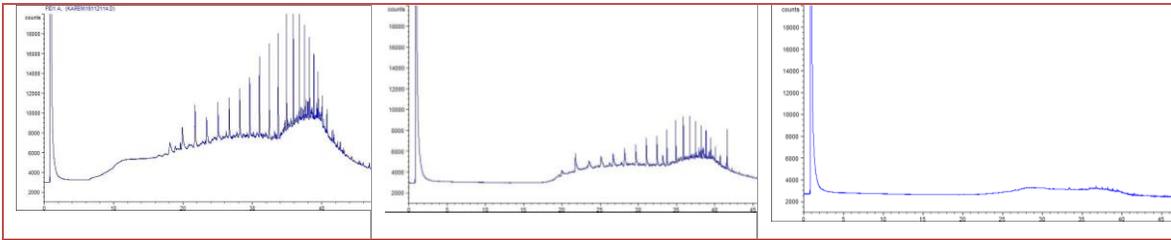


Fig. 25.- Comparación del perfil cromatográfico de *Vibrio sp* individualmente y en consorcio.

10.- *Bacillus cereus*

La cepa de *Bacillus cereus* degradó 22.6 % de petróleo crudo por sí sola y fue la cepa que más redujo la TS a un valor de 86.2 % y su índice de emulsión fue de 30%, al estar en consorcio la degradación aumentó a 33.2 %, sin embargo, no se observó índice de emulsión ni reducción de la TS. Lin y Cai en el 2008 estudiaron bacterias que degradan HCs aromáticos policíclicos, aislaron la cepa *Bacillus cereus* de un consorcio que extrajeron de un manglar y confirmaron que esta cepa degradó pireno en un 65.8 %.

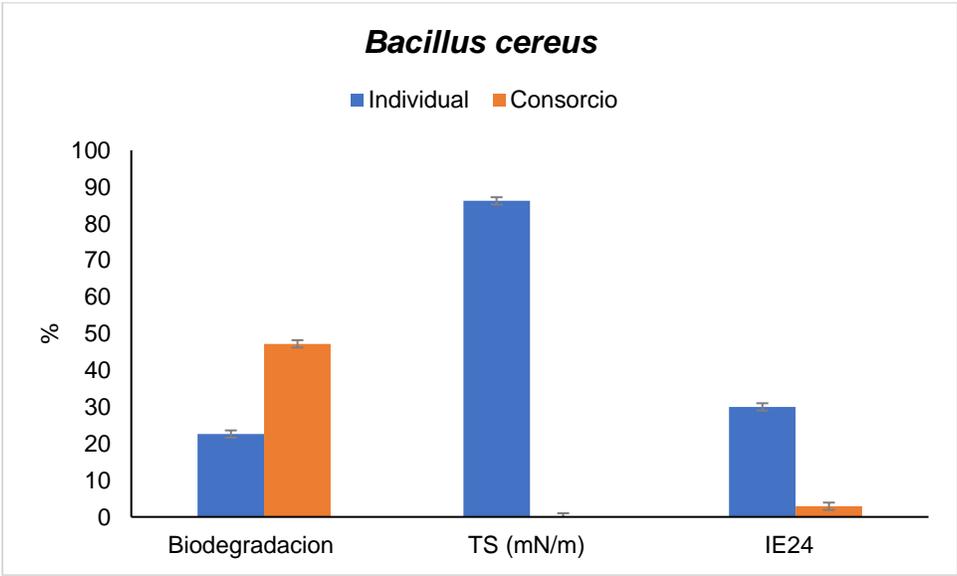


Fig. 26.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE₂₄ de la cepa *Bacillus cereus*, individualmente y en consorcio.

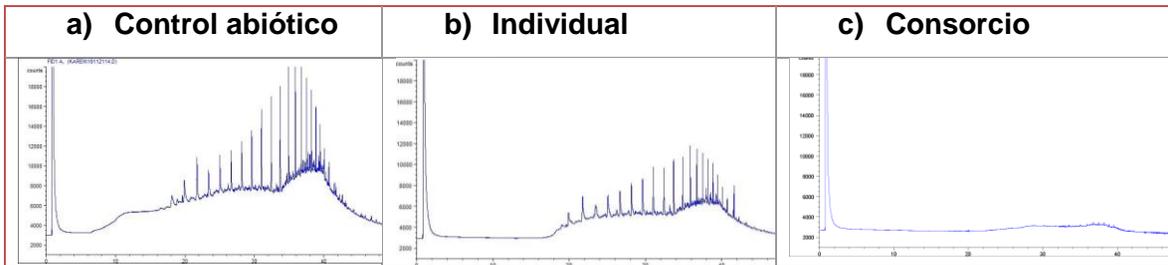


Fig. 27.- Comparación del perfil cromatográfico *Bacillus cereus* individualmente y en consorcio.

11.- *Microbacterium sp*

La cepa *Microbacterium sp* obtuvo un porcentaje de degradación del 12 % estando sola, mientras que estando en consorcio con las cepas restantes, aumentó su degradación a 38.6 % a los 30 días de incubación.

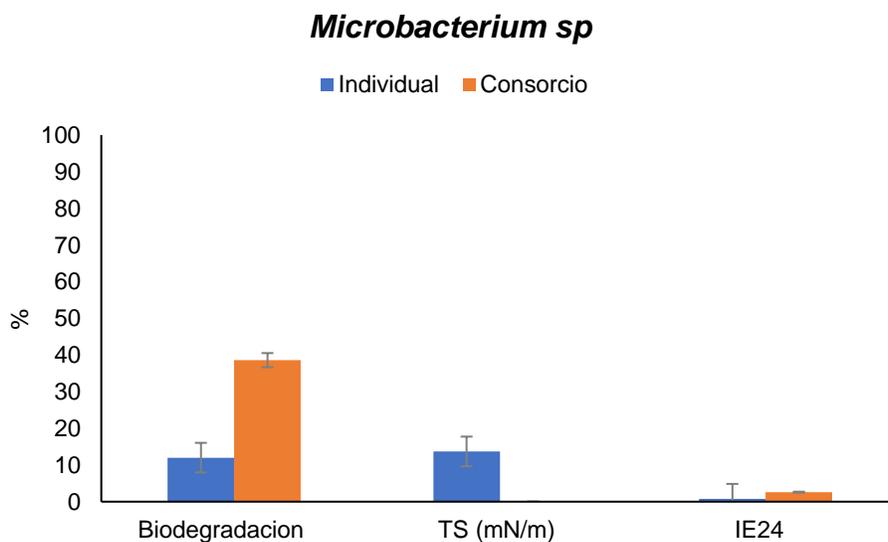


Fig. 28.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE₂₄ de la cepa *Microbacterium sp*, individualmente y en consorcio.

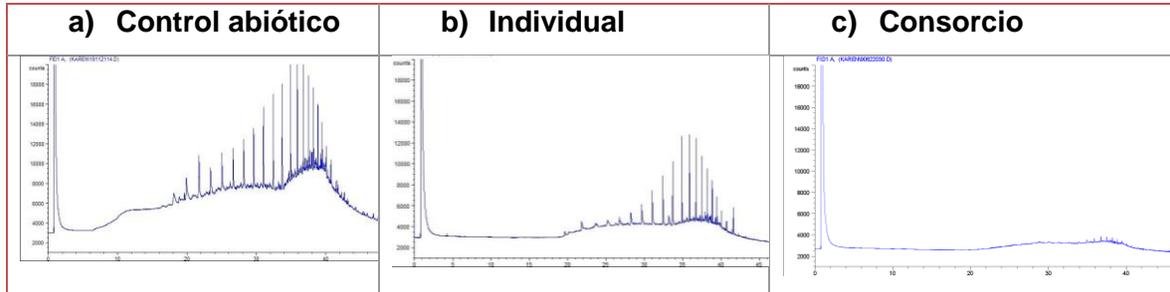


Fig. 29.- Comparación del perfil cromatográfico *Microbacterium sp* individualmente y en consorcio.

12.- *Idiomarina sp*

Fue la cepa que tuvo mayor porcentaje de degradación, alcanzando valores de 37% a los 12 días de incubación con el petróleo crudo, y de 40.1% a los 30 días. Podemos observar que esta cepa redujo solo un poco la tensión superficial, con valores de 53 y 40 a los 12 y 30 días, y valores de IE₂₄ de 0.8 y 5 % respectivamente. Como podemos observar, la degradación de HCs, no necesariamente está relacionada con la reducción de la tensión superficial o el índice de emulsión.

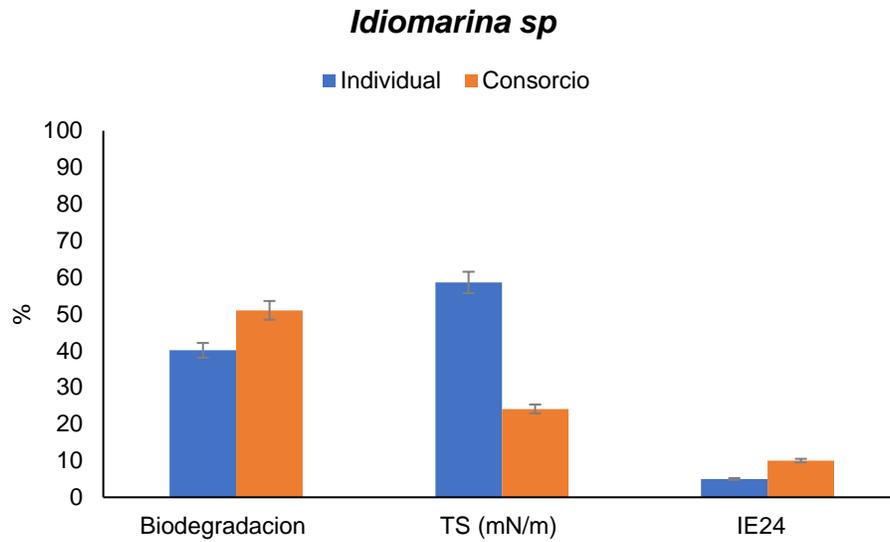


Fig. 30.- Gráfica comparativa del porcentaje de biodegradación, disminución de la TS e IE₂₄ de la cepa *Idiomarina sp*, individualmente y en consorcio.

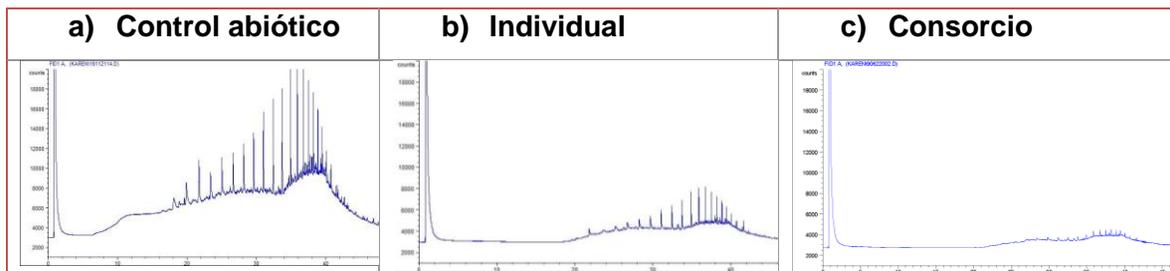


Fig. 31.- Comparación del perfil cromatográfico *Idiomarina sp* individualmente y en consorcio.

Los perfiles cromatográficos obtenidos muestran diferencias significativas en la degradación del petróleo crudo por cepa con respecto al control.

En la tabla 11 se muestra la comparativa general del % de degradación de cada una de las cepas de manera individual y estando en consorcio

Tabla 13.- Comparación del porcentaje de biodegradación de las cepas individuales con las cepas en consorcio, en un lapso de 30 días.

| Cepa | % de biodegradación (30 días) | | Pr > t |
|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|----------|
| | Individual | Consortio (cepa mayoritaria) | |
| <i>Pseudoalteromonas sp</i> | 17.47 ± 0.8 | 51 ± 0.8 | <.0001 |
| <i>Shewanella sp</i> | 9.6 ± 0.4 | 63.5 ± 0.6 | <.0001 |
| <i>Enterobacter sp</i> | 18.8 ± 1.2 | 39 ± 0.58 | <.0001 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 25.73 ± 0.6 | 50 ± 0.5 | <.0001 |
| <i>Thalassospira sp</i> | 17.4 ± 0.6 | 45.2 ± 1.1 | <.0001 |
| <i>Citrobacter sp</i> | 11 ± 0.8 | 42.8 ± 0.4 | <.0001 |
| <i>Micrococcus luteus</i> | 13 ± 0.6 | 53.87 ± 1 | <.0001 |
| <i>Erwinia sp</i> | 10.8 ± 0.4 | 36.6 ± 0.4 | <.0001 |
| <i>Vibrio sp</i> | 24.9 ± 0.8 | 55.6 ± 0.4 | <.0001 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 22.6 ± 1 | 47.2 ± 0.4 | <.0001 |
| <i>Microbacterium sp</i> | 12 ± 0.4 | 38.6 ± 0.6 | <.0001 |
| <i>Idiomarina sp</i> | 40.1 ± 0.6 | 51 ± 0.6 | 0.611 |

Si el valor de probabilidad (Pr) es <0.05 significa que la comparación del valor de las dos medias es significativamente diferente

El porcentaje de biodegradación aumentó significativamente en todos los consorcios bacterianos con respecto a la cepa individual, como era de esperarse. Esto comprueba que es más eficiente una mezcla con todas las cepas, que una cepa individual, también que las cepas pueden crecer en presencia de otras.

8.7.- Estudio del efecto de las cepas individuales

Se realizó un análisis de validación de cada una de las cepas de manera individual, Comparando el efecto de una cepa individual contra el efecto de las otras cepas de manera individual, las cepas que tuvieron un mayor efecto son las que están más cercanas a 1 (figura 57).

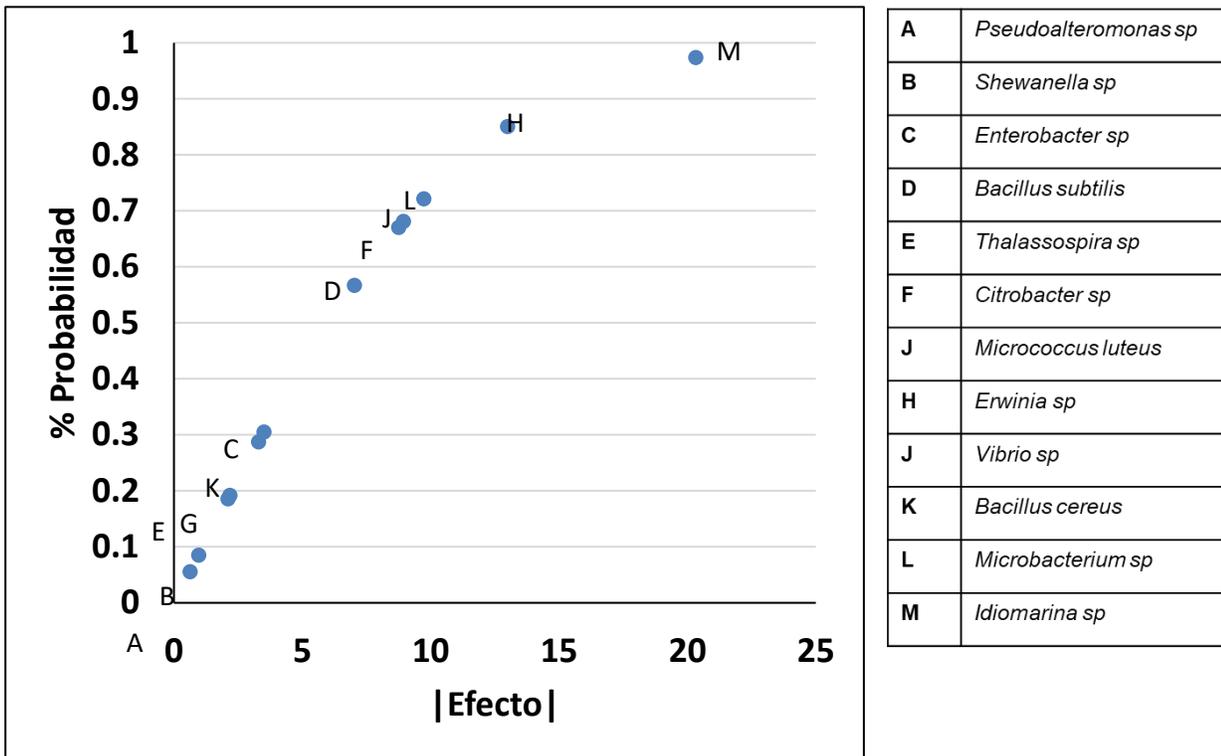


Fig. 32.- Gráfica del efecto de cada una de las cepas de manera individual, cada letra corresponde a una cepa. Las más cercanas a 1, son las que tuvieron un mayor efecto, por lo tanto, son mejores.

Las cepas que tuvieron un mejor efecto fueron *Idiomarina sp*, *Erwinia sp*, *Microbacterium* y *Vibrio*, ya que fueron las más cercanas a 1.

8.8.- Análisis del efecto de las interacciones entre las cepas

Se validó el modelo probabilístico con las combinaciones dobles de las cepas, para saber que efecto tenían una sobre la otra, como podemos ver en la figura 58, cada letra representa a una cepa diferente, las cepas que tuvieron un mejor o mayor efecto fueron las más cercanas a 1, por lo tanto, tuvieron una mayor probabilidad, estas cepas fueron la cepa A y B *Pseudoalteromonas sp* y *Shewanella sp*,

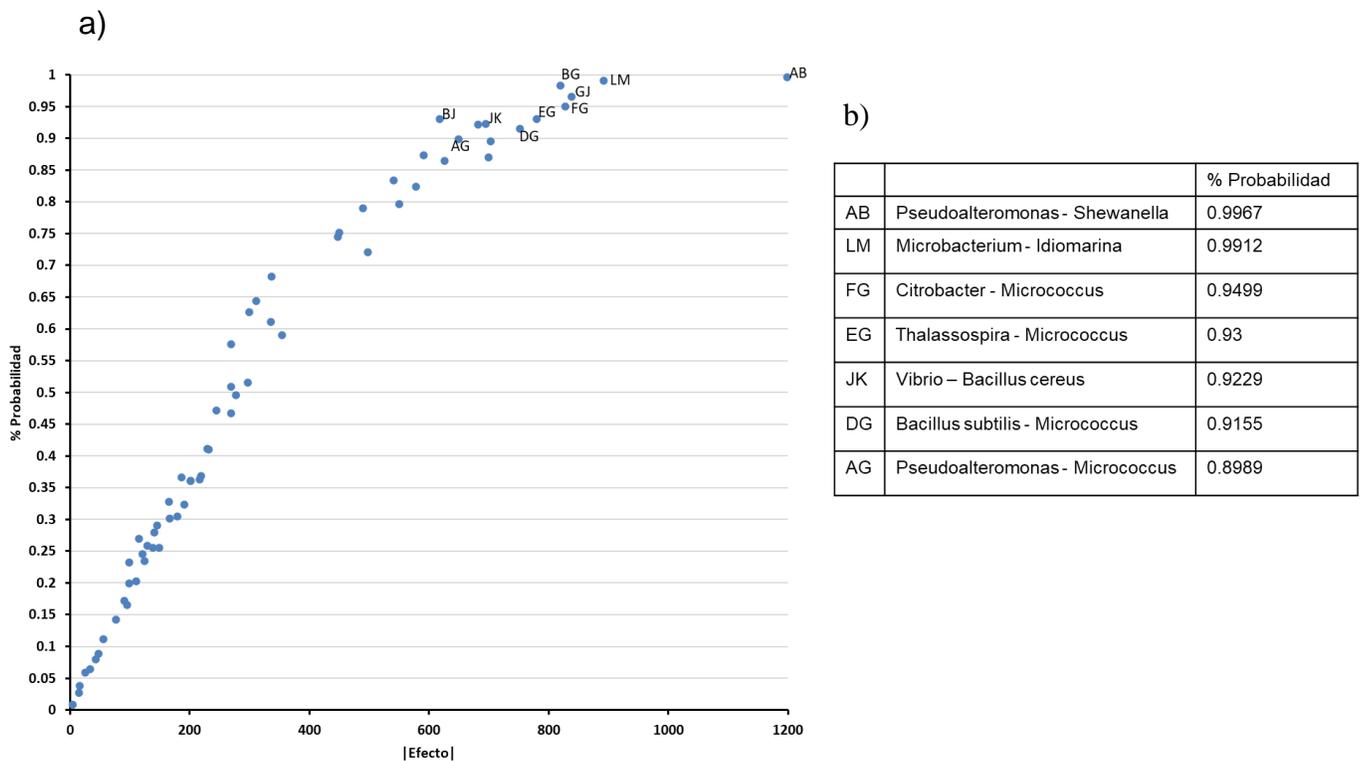


Fig. 33.- Análisis de las interacciones dobles entre cepas.

En la figura 58-b se observan las letras correspondientes a cada una de las cepas, que van de forma ascendente, de la interacción que tuvo un mayor efecto o probabilidad a la interacción que tuvo un menor efecto o probabilidad. Podemos observar que la interacción entre las cepas A y B fueron las más altas, con un efecto del 0.9967. Esto nos dice que estas dos cepas fueron las que mejor interaccionan entre sí, seguidas de la interacción entre las cepas L y M *Microbacterium sp* e *Idiomarina sp*, con un efecto del 0.9912, lo cual también es cercano al 100%.

Estos resultados nos arrojan que las interacciones entre estas cepas son las más favorables.

8.9.- Diseño del consorcio final

Para el diseño del consorcio final, únicamente tomamos en cuenta aquellas cepas que fueron estadísticamente significativas en la remoción del petróleo crudo, estas cepas fueron *Idiomarina sp*, *Microbacterium sp* y *Erwinia sp* (fig. 57). Se determinó que los 3 aislados con los efectos positivos más altos son los significativos y se seleccionaron para conformar el consorcio final.

En la siguiente gráfica se observa que, al mezclar estas cepas, en una proporción de 350 µl de *Microbacterium sp*, 350 µl de *Idiomarina sp* y por último 300 µl de *Erwinia sp* se obtendrían valores cercanos al 100% de degradación.

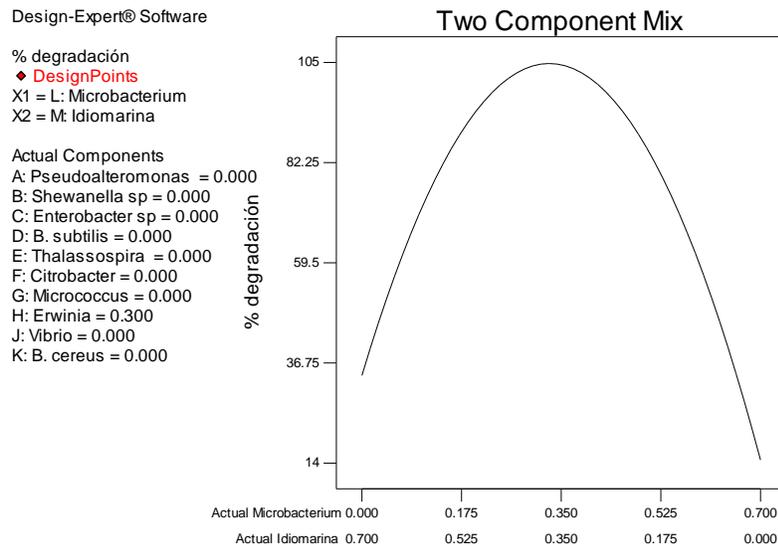


Fig. 34.- Gráfica representativa del % de degradación del petróleo crudo que se obtendría al mezclar las cepas mas significativas estadísticamente en la remoción del petróleo.

9.- Conclusiones

Todas las cepas estudiadas en el presente trabajo son capaces de degradar petróleo crudo con valores que van desde el 4% hasta el 35%. El porcentaje de degradación no aumenta significativamente al aumentar el tiempo de los ensayos. Sin embargo, sí notamos diferencia significativa en el porcentaje de degradación con las mezclas a 30 días con respecto de las cepas individuales. Lo que nos indica que existe un trabajo sinérgico entre ellas y que pueden coexistir.

Las mezclas que obtuvieron un mayor porcentaje de degradación fueron con las cepas mayoritarias de *Shewanella sp*, *Vibrio sp* y *Pseudoalteromonas sp*, con valores de 63.5 %, 55.6 % y 51 %, respectivamente.

Así mismo se demostró que la biodegradación en algunas cepas está correlacionada con la producción de metabolitos con actividad bioemulsificante y /o biotensoactiva, entre ellas las cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* redujeron la tensión superficial con valores de 31 y 36 mN/m a los 12 días, de 30 y 32 a los 30, respectivamente, así mismo tuvieron un % de IE₂₄ de 41 y 31 respectivamente, *Shewanella sp* y *Thalassospira* mostraron IE₂₄ de 20.3 y 20% respectivamente.

Ninguna mezcla redujo la tensión superficial (TS), sin embargo, la mezclas 2, 5 y 8 a los 12 días de incubación presentaron valores de IE₂₄ de 30, 13.4 y 27%. La mezcla 5 a los 30 días de incubación mostró valores de IE₂₄ de 12.5%.

La actividad biotensoactiva y bioemulsificante disminuyen con las mezclas, esto puede deberse a la competencia de nutrientes.

10.- Perspectivas

- Realizar análisis de metagenómica de las mejores mezclas, para saber la proporción de las cepas al final del experimento de degradación y saber cuál es la cepa mayoritaria y el efecto que tuvo hacia las demás.
- Probar mezclas en pares, con las cepas que tuvieron un mejor efecto.
- Probar las mezclas con diferentes tipos de petróleo (API)
- Realizar el fraccionamiento del remanente para determinar las fracciones que aún quedan y si la fracción aromática fue degradada o no, comparando contra un control, esto para saber si la degradación fue diferencial.

11.- Bibliografía

1. Acuña, A., Pucci, G., Morales, M. J., & Pucci, O. (2010). Biodegradation of petroleum and its derivatives by the bacterial community in the soil of the Argentinean Patagonia. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30(1), 29-36.
2. Akbari, S., Abdurahman, N. H., Yunus, R. M., Fayaz, F., & Alara, O. R. (2018). Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. *Biotechnology Research and Innovation*, 2(1), 81-90.
3. Bahena, E. I. N. (2020). Caracterización de la cepa *Idiomarina* B7H2 e identificación de genes asociados con la producción de exopolisacáridos con actividad emulsificante. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma del Estado de Morelos], RIAA.
4. Bayat, Z., Hassanshahian, M., & Hesni, M. A. (2015). Enrichment and isolation of crude oil degrading bacteria from some mussels collected from the Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin*, 101(1), 85-91.
5. Ben Said, O., Goñi-Urriza, M. S., El Bour, M., Dellali, M., Aissa, P., & Duran, R. (2008). Characterization of aerobic polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Bizerte lagoon sediments, Tunisia. *Journal of Applied Microbiology*, 104(4), 987-997.
6. Bertrand B., Martínez-Morales F., Rosas-Galván N., Morales-Guzmán D., Licea-Navarro, A.F., Trejo-Hernández M.R. Production, purification and characterization of an emulsifying agent of *Thalassospira* sp. isolated from petroleum polluted waters in the Gulf of Mexico. (Pendiente de publicación).
7. Breed R., Murray E. y Smith N. (1957). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams and Wilkins Company. <https://www.biodiversitylibrary.org/page/11178148>.
8. Brenner, K., You, L., & Arnold, F. H. (2008). Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in biotechnology*, 26(9), 483-489.
9. Chikere, C. B., Okpokwasili, G. C., & Chikere, B. O. (2011). Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *3 Biotech*, 1, 117-138.
10. Cooper, D. G., & Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, 53(2), 224-229.
11. Cui, J., Huang, L., Wang, W., Xu, P., Zanoarli, G., & Tang, H. (2020). Maximization of the petroleum biodegradation using a synthetic bacterial

- consortium based on minimal value algorithm. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 150, 104964.
12. Cui, Z., Lai, Q., Dong, C., & Shao, Z. (2008). Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology*, 10(8), 2138-2149.
 13. Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, 2011.
 14. Demeter, M. A., Lemire, J. A., Mercer, S. M., & Turner, R. J. (2017). Screening selectively harnessed environmental microbial communities for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in moving bed biofilm reactors. *Bioresource technology*, 228, 116-124.
 15. Deppe, U., Richnow, H. H., Michaelis, W., & Antranikian, G. (2005). Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium. *Extremophiles*, 9, 461-470.
 16. Desai, C., Pathak, H., & Madamwar, D. (2010). Advances in molecular and “-omics” technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites. *Bioresource Technology*, 101(6), 1558-1569.
 17. Ekprasert, J., Laopila, K., & Kanakai, S. (2019). Biosurfactant production by a newly isolated *Enterobacter cloacae* B14 capable of utilizing spent engine oil. *Polish Journal Environmental Studies*, 28(4), 2603-2610.
 18. Fernandez, R. (2023). Volumen de petróleo producido a nivel mundial 1998-2021. Statista. <https://es.statista.com/estadisticas/635470/volumen-de-petroleo-producido-a-nivel-mundial/>
 19. Freitas Soares, D. W. (2014). Producción y caracterización de biosurfactantes obtenidos por linajes de *Bacillus* sp. aisladas de estaciones del tratamiento de depuración de aguas residuales y del suelo de manglar (Brasil). [Tesis Doctoral, Universidad de Granada], Digibug.
 20. Kumar, A. G., Rajan, N. N., Kirubakaran, R., & Dharani, G. (2019). Biodegradation of crude oil using self-immobilized hydrocarbonoclastic deep sea bacterial consortium. *Marine pollution bulletin*, 146, 741-750.
 21. García-Cruz, N. U., & Aguirre-Macedo, M. L. (2014). Biodegradación de petróleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México. *Golfo de*

México: Contaminación e Impacto Ambiental, Diagnóstico y Tendencias; Botello, AV, Rendón von Osten, J., Benítez, JA, Gold-Bouchot, G., Eds, 641-652.

22. Hara, A., Syutsubo, K., & Harayama, S. (2003). Alcanivorax which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation. *Environmental Microbiology*, 5(9), 746-753.
23. Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., & Shutsubo, K. (1999). Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 1(1), 63-70.
24. Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of hazardous materials*, 169(1-3), 1-15.
25. Herzka, S. Z., Zaragoza Alvarez, R.A., Peters, E.M., y Hernandez Cardenas, G. (Coord. Gral) (2021). Atlas de línea de base ambiental del Golfo de México. México: Consorcio de Investigación del Golfo de Mexico.
26. Jia, H., & Yuan, Q. (2016). Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae–bacteria consortia. *Cogent Environmental Science*, 2(1), 1275089.
27. Ivanova, E. P., Flavier, S., & Christen, R. (2004). Phylogenetic relationships among marine Alteromonas-like proteobacteria: emended description of the family Alteromonadaceae and proposal of Pseudoalteromonadaceae fam. nov., Colwelliaceae fam. nov., Shewanellaceae fam. nov., Moritellaceae fam. nov., Ferrimonadaceae fam. nov., Idiomarinaceae fam. nov. and Psychromonadaceae fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(5), 1773-1788.
28. Lindemann, S. R., Bernstein, H. C., Song, H. S., Fredrickson, J. K., Fields, M. W., Shou, W., & Beliaev, A. S. (2016). Engineering microbial consortia for controllable outputs. *The ISME journal*, 10(9), 2077-2084.
29. Lin, Y., & Cai, L. X. (2008). PAH-degrading microbial consortium and its pyrene-degrading plasmids from mangrove sediment samples in Huian, China. *Marine Pollution Bulletin*, 57(6-12), 703-706.
30. Madigan, M. T., Martinko, J. M. (2006). Brock Biology of Microorganisms. Reino Unido: Pearson Prentice Hall.

31. Machín-Ramírez, C., Okoh, A. I., Morales, D., Mayolo-Deloisa, K., Quintero, R., & Trejo-Hernández, M. R. (2008). Slurry-phase biodegradation of weathered oily sludge waste. *Chemosphere*, 70(4), 737-744.
32. Malik, Z., & Ahmed, S. (2012). Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium. *African Journal of Biotechnology*, 11(3), 650-658.
33. McGenity, T. J., Folwell, B. D., McKew, B. A., & Sanni, G. O. (2012). Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquatic biosystems*, 8, 1-19.
34. McKew, B. A., Coulon, F., Osborn, A. M., Timmis, K. N., & McGenity, T. J. (2007). Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environmental microbiology*, 9(1), 165-176.
35. Morales-Guzmán, D., Martínez-Morales, F., Bertrand, B., Rosas-Galván, N. S., Curiel-Maciel, N. F., Teymennet-Ramírez, K. V., ... & Trejo-Hernández, M. R. (2021). Microbial prospection of communities that produce biosurfactants from the water column and sediments of the Gulf of Mexico. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 68(6), 1202-1215.
36. Orozco Murillo, M. P., & Solarte, J. A. (2003). Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa. *Ingeniería Química*.
37. Pardo López, L., y Gutiérrez Ríos, R.M. (Eds.) (2021). Distribución de bacterias. En S. Z. Herzka, R. A. Zaragoza Álvarez, E. M. Peters y G. Hernández Cárdenas. (Coord. Gral.). *Atlas de línea base ambiental del golfo de México (tomo X)*, México: Consorcio de Investigación del Golfo de México.
38. 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, 279.
39. Rahman, K. S. M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., & Banat, I. M. (2002). Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource technology*, 85(3), 257-261.
40. Ramírez, N., Sandoval, A. H., & Serrano, J. A. (2004). Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24(1-2), 12-23.
41. Ranasalva, N., Sunil, R., & Poovarasan, G. (2014). Importance of biosurfactant in food industry. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 7, 6-9.

42. Rodríguez Aristizabal, M. A., Higuera Mora, N. C., & Sanjuanelo Corredor, D. W. (2019). Bacterias halófilas con potencial para la recuperación de suelos salinizados en Sáchica-Boyacá, Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 67(3), 621-632.
43. Rojas Vargas J. A. (2023). Diseño de un consorcio bacteriano con capacidad degradadora de petróleo ligero en agua de mar. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional, Autónoma de México], Tesiunam.
44. Rosas Díaz J. (2020) Diseño de un consorcio bacteriano sintético para degradar compuestos aromáticos monocíclicos. [Tesis de maestría, Universidad Nacional, Autónoma de México], Tesiunam.
45. Sakthipriya, N., Doble, M., & Sangwai, J. S. (2015). Fast degradation and viscosity reduction of waxy crude oil and model waxy crude oil using *Bacillus subtilis*. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 134, 158-166.
46. Salleh, A. B., Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., & Basri, M. (2003). Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution. *Indian Journal of Biotechnology*, 2, 411-425.
47. Sharma, S., & Pandey, L. M. (2020). Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* RSL-2 isolated from sludge and biosurfactant mediated degradation of oil. *Bioresource Technology*, 307, 123261.
48. Sugiura, K., Ishihara, M., Shimauchi, T., & Harayama, S. (1996). Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environmental Science & Technology*, 31(1), 45-51.
49. Tian, X., Wang, X., Peng, S., Wang, Z., Zhou, R., & Tian, H. (2018). Isolation, screening, and crude oil degradation characteristics of hydrocarbons-degrading bacteria for treatment of oily wastewater. *Water Science and Technology*, 78(12), 2626-2638.
50. Tuleva, B., Christova, N., Jordanov, B., Nikolova-Damyanova, B., & Petrov, P. (2005). Naphthalene degradation and biosurfactant activity by *Bacillus cereus* 28BN. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60(7-8), 577-582.
51. Deppe, U., Richnow, H. H., Michaelis, W., & Antranikian, G. (2005). Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium. *Extremophiles*, 9, 461-470.

52. Vázquez Núñez, E., García Gaytán, A., Luna-Guido, M., Marsch, R., & Dendooven, L. (2009). Impact of moisture dynamic and sun light on anthracene removal from soil. *Biodegradation*, 20, 191-198.
53. Venkidusamy, K., Hari, A. R., & Megharaj, M. (2018). Petrophilic, Fe (III) reducing exoelectrogen *Citrobacter* sp. KVM11, isolated from hydrocarbon fed microbial electrochemical remediation systems. *Frontiers in Microbiology*, 9, 349.
54. Wang, D., Lin, J., Lin, J., Wang, W. y Li, S. (2019). Biodegradación de HCs de petróleo por *Bacillus subtilis* BL-27, una cepa con hidrofobicidad débil. *Molecules (Basilea, Suiza)*, 24 (17), 3021.
55. Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., ... & Yu, H. (2018). Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis. *Frontiers in microbiology*, 9, 2885.
56. Yuan, J., Lai, Q., Zheng, T., & Shao, Z. (2009). *Novosphingobium indicum* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from a deep-sea environment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(8), 2084-2088.
57. Zan, S., Lv, J., Li, Z., Cai, Y., Wang, Z. y Wang, J. (2021). Conocimientos genómicos de *Pseudoalteromonas* sp. JSTW frente a la contaminación combinada de petróleo y metales pesados. *Revista de Microbiología Básica*. 1-11.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 26 de junio del 2023.

VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: **Diseño de un consorcio bacteriano sintético con capacidad de degradar petróleo crudo**, que presenta la **C. Karen Plata Oliveros**, del Programa de Posgrado Maestría en Biotecnología, bajo la dirección de la DRA. MARÍA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO**.

Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

DRA. MARIA DEL REFUGIO TREJO HERNANDEZ (director de tesis, CEIB UAEM)

DR. FERNANDO MARTINEZ MORALES (CEIB UAEM)

DRA. IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO (CEIB UAEM)

DR. HUGO ALBEIRO SALDARRIAGA NOREÑA (CIQ UAEM)

DR. MARIO ALFONSO MURILLO TOVAR (CIQ UAEM)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FERNANDO MARTINEZ MORALES | Fecha:2023-06-30 10:00:13 | Firmante

O1c48Bw+oF9IHlqwbLVL74fkaa0fLrXC6/hlYINW69+1QeSFJ7710+rESdksfPAxiWQ2DSui107MwylyUauSkWEJJ5sd/a/mxkz1TDg/Hk4XY11LrmiTZ4IQ23s/3Lxvifc9Jf5oO3Zq8Im
heTfuoSxiSJAwl0zZL/xOJl1aeF+T8RQmk/v+0XGXw88T/60fo0cw3c71lvkfDZQkqj40/uJvqz5db+/6LiBzSz9v+r6eYb/hHA4Gxj5uO3zvBWhXOCYo4bTRtsUpcg9Z6xPw+hvK3lB
aSsWLptwVlhBBeMDapqfll69rx/ZKjJR63BNOcKG3dNXVli34gAeQ==

HUGO ALBEIRO SALDARRIAGA NOREÑA | Fecha:2023-06-30 10:14:13 | Firmante

TjGlmLe9deHjdTrUGek9m1WHpsDDGDBwLmp6sB+/oHqIsGXZLOMGZNG1H9uGyJojkbGlgBLFSePVODIUQ0JAXz6tkV++0saMoxcCPGwBxiYUpzil6CrZHBJOWT2z84S56sb
dwizaTSFuloHegKyvGgdHiBkQd44rAFsAHFF4BjTBEIUM7mR/rCpAq0qbKmu9e9pinAT4DHICCRHW+ibO+BAPSjF7qmc7D31DPGk4N8LWDX8EKZWWpDyHk188UyjTXO3Ke
08YKx5ol3VVT4PdUimFIOaf3VidRS4eQXfmVcywQc+P+sMMgl2v4DTJTVzayy0KrWYh6lFmWETj+vAg==

MARIO ALFONSO MURILLO TOVAR | Fecha:2023-06-30 10:18:50 | Firmante

jOMPE+iTRUGk+CvbfYNfSud+llo9AuHUsZeLkw8R3CV+IRVQHA5SCA9Eh58KR/JcvEGLRVpbCIC0HksVTgmiR8DCbBJ3XB9VWLXd6iE1+umqPTxplfaSvmM6E1nE50FBM8Q
+rmA+PFpkqyfoAZutil/DKNhHBoq0DJD/DJlv09HI/WoAlFr4lhwFBHH/cnzrhCZK9+DIV43KGXuMjm20/3Aq6exlISiEh10dTUSzJSVE5XSbIZvKwdd6M7FE11Nn4XSvKMDrIUlb8V
R2DlaUXThbbUZ6EQCKZcjhpGzwc6MoRcpwtNmHwpj1Zmkv+Akb4v/Cpizlrfg1MbpmlGSW==

MARIA DEL REFUGIO TREJO HERNANDEZ | Fecha:2023-06-30 11:23:26 | Firmante

dXN2Q5VvLXkHfjsBaYu+xW6u5wJ2fSi3jnc+Z71UP3gpAN6PO43ca/LL22OAV7av3KyuuqS9m0klukp7bmLv9cHStOOH+RDMYovvZjbVVMdbkLRvr5iSj3RAWhhPvhZcTo1sA1qfo
fd9XCvZQWLT1fVT5DqeoZ443Xex4DQVa3Q9Styw6e3AJP+OnmfK1WqMoBYkCdL4XfzMdwUqRZLFmHwxpxfO2g56RDENS/QeAmkKj5loj8Twd66Dd1OhUdvFouoc6e1x7l+
WXXLVnbpODOPKuBhd+bcg4AJ5zXg5HISVZcu4sCOVlv3cEGBWAxpPO0SelWCINNxdYaWXsmJA==

IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO | Fecha:2023-07-03 09:13:39 | Firmante

t32z3imMtz3/FYpCWOpW2Sn8gumT9x32eEXODWivz0lbeYgJELzsEM6TH66G0bt9wc0wjyOUKY8/L30N2tcBQNJkEps+pKuHvbKh6qYr1peuVwugxtA1YJanHclaqSqiKqyqj86JAI
qVXJv5IOAeRMjvmfzcsSlwY8Lm66amzWHvarWH1Y03v4zpX/kl+xrnJkAtQSQc7vVQf4L8VPGVa0yqUvKinZPe2nmGjv2LMDg01Sn1AmAmmEFW00+tC9lrlVohXYJbKpIN1Tu4
RZTuNFqL7JPX4jZYoR6xFQmFuCV+C3ebGdpJ76pysr4Un/mynpelMznPKg1rcHi0odZYA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



t09udA3w0

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/juPOjT88bidruulT4pfDnBfa1xtqRgWU>

