



Universidad Científica del Perú - UCP
*Registrado en el Asiento N° A00010 de la Partida N° 11000318, Personas Jurídicas de Iquitos,
Superintendencia de los Registros Públicos - SUNARP*

**FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
PROGRAMA ACADÉMICO DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

PROYECTO DE TESIS

**“OBTENCIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO BIODEGRADADOR
DE PETRÓLEO A PARTIR DE LAS AGUAS TERMALES DE
CONTAMANA, LORETO 2021”.**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AMBIENTAL**

AUTORA: Br. Corayma Lucero Cabezudo Cobos

ASESORA: Blga. Marianela Cobos Ruiz Dra.

CO-ASESOR: Blgo. Juan Carlos Castro Gómez Dr.

San Juan Bautista – Maynas – Loreto - Perú.

2022

DEDICATORIA

La presente tesis la dedico principalmente a Dios, por ser el inspirador y darme fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A mis padres, Remy Orlando Cabezudo Gutiérrez y Charito Cobos Ruiz, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años.

A todas las personas que han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito, en especial a aquellas que nos abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

AGRADECIMIENTO

Al Proyecto de Investigación RR-1152-2020-UNAP “Purificación de ADN Metagenómico de Aguas termales” por brindarme los reactivos e insumos químicos requeridos para la presente tesis.

Al Proyecto de Investigación convenio 018-2018-FONDECYT/BM “Adquisición de un Sistema de Secuenciamiento Masivo NextSeq 550 Como Soporte para Estudios Genómicos y Metagenómicos de la Biodiversidad de la Amazonia Peruana” por brindarme los reactivos e insumos químicos requeridos para la presente tesis.

Al Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú por permitir el uso de sus equipos, materiales y reactivos utilizados durante el proceso del desarrollo de la tesis.

A mi asesora, la Dra. Marianela Cobos Ruiz y a mi Co-asesor el Dr. Juan Carlos Castro Gómez por brindarme la confianza y oportunidad para llevar a cabo la presente tesis, por sus paciencia, dedicación y conocimiento que me brindaron durante todo el proceso. A ustedes mis más sinceros agradecimientos.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio, Segundo Levi Estela, Marjorie Tatiana del Águila, Miguel Grandez, Carlos Castro, Pedro Vela, Ruth Condori, Paula Gálvez, Margarita Torres, por el apoyo brindado durante el proceso de realización de la tesis en el laboratorio.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron a la culminación de la tesis, a todos ellos MUCHAS GRACIAS.

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL PERÚ - UCP

El presidente del Comité de Ética de la Universidad Científica del Perú - UCP

Hace constar que:

La Tesis titulada:

**“OBTENCIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO BIODEGRADADOR DE
PETRÓLEO A PARTIR DE LAS AGUAS TERMALES DE CONTAMANA, LORETO
2021”**

De los alumnos: **CORAYMA LUCERO CABEZUDO COBOS**, de la Facultad de Ciencias e Ingeniería, pasó satisfactoriamente la revisión por el Software Antiplagio, con un porcentaje de **4% de plagio**.

Se expide la presente, a solicitud de la parte interesada para los fines que estime conveniente.

San Juan, 14 de Julio del 2022.



Dr. César J. Ramal Asayag
Presidente del Comité de Ética – UCP



"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

Con Resolución Decanal N° 009-2022-UCP-FCEI del 06 de enero del 2022, la FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA DE LA UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL PERÚ - UCP designa como Jurado Evaluador de la sustentación de tesis a los señores:

- Ing. Carmen Patricia Cerdeña del Águila, Dra. Presidente
- Ing. Gustavo Fernando Gamarra Ramírez, Mgr. Miembro
- Ing. Giorgio Sergio Urro Rodriguez, M.Sc. Miembro

Como Asesor: a la **Blga. Marianela Cobos Ruiz, Dra.**

En la ciudad de Iquitos, siendo las 12:00 horas del día 19 de julio del 2022, a través de la plataforma ZOOM supervisado en línea por el Secretario Académico del programa Académico de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Universidad Científica del Perú., se constituyó el Jurado para escuchar la sustentación y defensa de la Tesis: **"OBTENCIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO BIODEGRADADOR DE PETRÓLEO A PARTIR DE LAS AGUAS TERMALES DE CONTAMANA, LORETO 2021"**

Presentado por la sustentante: **CORAYMA LUCERO CABEZUDO COBOS**

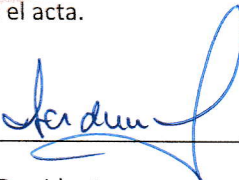
Como requisito para optar el título profesional de: **INGENIERO AMBIENTAL**

Luego de escuchar la sustentación y formuladas las preguntas las que fueron: **ABSUELTAS**

El Jurado después de la deliberación en privado llegó a la siguiente conclusión:

La sustentación es: **APROBADA POR UNANIMIDAD**

En fe de lo cual los miembros del Jurado firman el acta.



Presidente

Miembro

Miembro

Contáctanos:

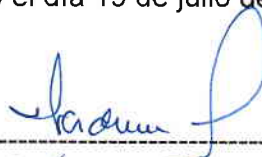
Iquitos – Perú
065 - 26 1088 / 065 - 26 2240
Av. Abelardo Quiñones Km. 2.5

Filial Tarapoto – Perú
42 - 58 5638 / 42 - 58 5640
Leoncio Prado 1070 / Martines de Compañón 933

Universidad Científica del Perú
www.ucp.edu.pe

HOJA DE APROBACIÓN

Tesis sustentada en acto público el día 19 de julio del 2022 a las 12 hrs



Ing. Carmen P. Cerdeña del Águila, Dra.
PRESIDENTA DEL JURADO



Ing. Gustavo Fernando Gamarra Ramírez, Mgr.
MIEMBRO DEL JURADO



Ing. Giorgio Sergio Urro Rodríguez, M.Sc.
MIEMBRO DEL JURADO

ASESORA



Blga. Marianela Cobos Ruiz Dra.

Co-Asesor



Blgo. Juan Carlos Castro Gómez Dr.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág
Caratula	i
Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Constancia de originalidad	iv
Acta de sustentación	v
Hoja de aprobación	vi
Resumen	x
Abstract	xi
Capítulo I. Marco teórico	1
1.1. Antecedentes del estudio	1
1.2. Bases teóricas	5
1.3. Definición de términos básicos	8
Capítulo II. Planteamiento del problema	10
2.1. Descripción del problema	10
2.2. Formulación del problema	11
2.2.1. Problema general	11
2.2.2. problemas específicos	11
2.3. Objetivos	11
2.3.1. Objetivo general	11
2.3.2. Objetivos específicos	11
2.4. Hipótesis	12
2.5. Variables	12
2.5.1. Identificación de las variables	12
2.5.1.1. Variable Dependiente	12
2.5.1.2. Variable Independiente	12
2.5.2. Definición conceptual y operacional de las variables	12
2.5.3. Operacionalización de las variables	13

Capítulo III. Metodología	14
3.1. Tipo y diseño de investigación	14
3.2. Población y muestra	14
3.2.1. Población	14
3.2.2. Muestra	14
3.3. Técnicas, instrumentos y procedimientos de recolección de datos	14
3.3.1. Técnicas de recolección de datos	14
3.3.2. Instrumento de recolección de datos	15
3.3.3. Procedimiento y análisis de datos	15
3.4. Procesamiento y análisis de datos	17
Capítulo IV. Resultados	18
Capítulo V. Discusión, Conclusión y Recomendaciones	21
5.1. Discusión	21
5.2. Conclusiones	23
5.3. Recomendaciones	24
Referencias bibliográficas	
Anexos	

ÍNDICE DE TABLAS

N°	TITULO	Pág.
01.	Concentración de polifenoles obtenidos durante los 30 días de evaluación	20

ÍNDICE DE FIGURAS

N°	TITULO	Pág.
01.	Células bacterianas observadas con Tinción de gram	17
02.	Células bacterianas observadas en microscopio a 100 X teñidas con bromuro de etidio	17
03.	Perfil de crecimiento de consorcios microbianos expuestos a petróleo crudo durante 30 días de evaluación.	19

RESUMEN

Los consorcios microbianos son asociaciones naturales que adoptan las comunidades microbianas, actuando en conjunto y generando sistemas complejos que les genera beneficios. El objetivo principal de la investigación fue obtener un consorcio microbiano biodegradador de petróleo a partir de las aguas termales de Contamana. El criterio de selección de la muestra, fue la temperatura de las aguas superficiales, las cuales fueron superiores a 40°C. Se cultivó los consorcios microbianos en matraces Erlenmeyer con medio de cultivo BH y petróleo crudo y se evaluaron durante 30 días. Los consorcios microbianos fueron observados con tinción gram por microscopía de fluorescencia, el perfil de crecimiento y degradación del crudo fue cuantificado por espectrofotometría. Los resultados nos muestran que las formas bacterianas más comunes presentes en las muestras, son los cocos y cocobacilos, pertenecientes a gram positivas y gram negativas. El perfil de crecimiento microbiano fue gradual obteniendo valores superiores a 0,070 nm. de absorbancia, respecto al grupo control que se mantuvo con valores más bajos. La estimación de la degradación de petróleo por medio de la de cuantificación de los polifenoles totales, mostraron resultados que fluctuaron de entre 40,20 a 13,20 mg/L. En conclusión, los resultados nos indican que los consorcios microbianos procedentes de aguas termales presentan la capacidad para degradar petróleo crudo.

Palabra clave: Consorcios microbianos, aguas termales, petróleo, biodegradación.

ABSTRACT

Microbial consortia are natural associations adopted by microbial communities, acting together and generating complex systems that generate benefits for them. The main objective of the research was to obtain an oil biodegrading microbial consortium from the thermal waters of Contamana. The sample selection criterion was the temperature of the surface waters, which were higher than 40°C. Microbial consortia were cultured in Erlenmeyer flasks with BH culture medium and crude oil and evaluated for 30 days. The microbial consortia were observed with gram staining by fluorescence microscopy, the growth profile and crude oil degradation were quantified by spectrophotometry. The results show that the most common bacterial forms present in the samples are cocci and Coccobacillus, both gram positive and gram negative. The microbial growth profile was gradual, obtaining values greater than 0.070 nm. of absorbance, compared to the control group that maintained lower values. The estimation of oil degradation through the quantification of total polyphenols, showed results that fluctuated between 40.20 and 13.20 mg/L. In conclusion, the results indicate that microbial consortia from hot springs have the ability to degrade crude oil.

Keyword: Microbial consortia, hot springs, oil, biodegradation.

Capítulo I. Marco teórico

1.1. Antecedentes de estudio

La edad de la tierra se estima en 4 500 millones de años, durante la mayor parte de este tiempo, los habitantes de la tierra existieron en forma de organismos unicelulares simples. Un cambio fundamental ocurrió durante el periodo cámbrico (hace aproximadamente 545 millones de años), que a menudo se conoce como la “explosión cámbrica” debido a la magnitud de los cambios que ocurren. El escenario actualmente aceptado con respecto al origen de los hidrocarburos de petróleo se basa en el siguiente concepto: la materia orgánica fósil quedó atrapada en la roca madre (kerógeno) y pasó por varias etapas de transformaciones. Desde un punto de vista químico, los sustratos son una mezcla de compuestos orgánicos de alto peso molecular formados debido a la degradación de sustancias poliméricas naturales presentes en la biomasa residual (1).

Los microorganismos desempeñan un papel importante durante las etapas iniciales de la formación de hidrocarburos (diagénesis) e influyen significativamente en la composición final del petróleo crudo disponible comercialmente, como lo demuestra su dispersión, clases diferentes. Además, dado que los hidrocarburos no derivados del petróleo son omnipresentes en el medio ambiente a un nivel bajo, los microbios pueden interactuar con ellos (2). La biorremediación ha sido evaluada en varios estudios como una opción para tratar la contaminación por hidrocarburos resultante del derrame o fuga de petróleo crudo y combustibles en el medio ambiente. La degradación de alcanos de cadena larga por mesófilos a temperaturas entre 25 y 28 °C se ha estudiado ampliamente en contraste con las vías de biodegradación en termófilos que aún no están bien caracterizados (3).

Estudios relativos sugieren que los degradadores de hidrocarburos como las bacterias de los géneros, *Thermus*, *Thermococcus* y

Thermotoga, y las especies que se encuentran en ambientes naturales de alta temperatura o ricos en azufre son de especial importancia, ya que podrían usarse eficientemente para la biorremediación de suelos desérticos contaminados por petróleo, sedimentos en climas semiáridos con veranos largos y calurosos y en proceso de compostaje (4).

Por lo ya mencionado; Manzur en el 2018, para obtener su tesis de licenciatura, evaluó el crecimiento de microalgas expuestas a diferentes concentraciones de petróleo crudo, encontró que el crecimiento celular fue óptimo, alcanzando densidades de hasta 0,350 nm. de absorbancia (5). Así mismo se logró aislar e identificar nuevas cepas bacterianas degradadoras de petróleo en la isla de Kharg en Irán utilizando como medio sal mineral, el cual contenía 2% de petróleo crudo como única fuente de carbono, las tasas de crecimiento a 600 nm. dieron resultados de hasta 0,80 nm. de absorbancia para las *Pseudomonas* sp. (6).

De igual forma, Cortez en el 2015 (7), en su tesis titulada, "Aislamiento de microorganismos productores de celulasas alcalinas de aguas termales y suelos de bosques de Contamana", logró aislar 26 cepas microbianas, de los cuales 22 pertenecían a bacterias y 4 a hongos, utilizando medios de cultivo enriquecidos con celulosa granular. La identificación por análisis de secuenciación de los productos de PCR, dio como resultado con un 99% de similitud a los géneros *Geobacillus*, *Bacillus* y *Aspergillus*. También, cuando se evaluó la capacidad de biodegradación de diésel por *Chromobacterium violaceum*, se determinó que hubo una disminución de la tasa de degradación de hidrocarburos (8).

Las investigaciones llevadas en condiciones extremas como son las aguas termales de la selva peruana, en temperaturas que oscilaban entre 45 a 90 °C, en el cual utilizaron secuenciamiento de la región variables 16S V3-V4, lograron identificar 58 filos de bacterias y 2 de

arqueas, siendo el filo más abundante las proteobacterias (88,06 %), Thermi (6,43%), Firmicutes (3,41 %) y Aquificae (1,10%) (9).

En Ecuador un grupo de investigadores identificaron en las fuentes de aguas termales “La merced”, 13 clones bacterianos correspondientes a las especies *Brevundimonas diminuta*, *Aeromonas Schubertii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Bacillus* spp, *Pseudomonas stutzeri* (10). En la tesis denominada “Caracterización biotecnológica de microorganismos aislados de aguas termales en el balneario “Piscinas el Cachaco-Calacalí” Provincia de Pichincha”, Ecuador, realizaron la caracterización microbiológica, encontraron que el 82% de las bacterias aisladas fueron Gram negativas, prevaleciendo el género *Staphylococcus*, mientras que un 18% fueron Gram positivas, prevaleciendo el género *Aeromonas* (11).

En México en las Bahías hidrotermales de Concepción, utilizando secuencias de genes parciales de 16S ARNr, encontraron 22 cepas bacterianas, de las cuales identificaron los géneros *Nitratireductor*, *Ornithinibacillus*, *Bacillus* y las especies *Bacillus licheniformis* y *Synechococcus elongatus* (12). Así mismo en el norte del Golfo de México, lograron aislar 100 cepas bacterianas, que crecen en aguas superficiales contaminadas con petróleo, de las cuales nueve producían sustancias poliméricas extracelulares (13).

En un estudio desarrollado en los respiradores hidrotermales de la cordillera del Atlántico Medio Sur, en el cual utilizaron cultivos microbianos enriquecidos a partir de sedimentos, mediante cromatografía de gases, espectrometría de masas y análisis gravimétrico encontraron que los géneros bacterianos *Pseudomonas*, *Nitratireductor*, *Acinetobacter* y *Brevundimonas* presentan capacidad para degradar aceites. Los cultivos enriquecidos, después de 14 días de evaluación logran degradar entre el 88 y 95 % de los alcanos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (14).

Así mismo, Investigadores en China, lograron aislar siete cepas microbianas capaces de degradar suelos contaminados por hidrocarburos. Los resultados mostraron una eficacia de eliminación de hasta el 50% de hidrocarburos totales de petróleo (15). Cinco consorcios bacterianos libres e inmovilizados de un medio marino en la costa de Zhejiang en China, fueron aisladas, entre ellos se encontraban *Exiguobacterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes* sp., *Alcaligenes* sp. y *Bacillus* sp, obteniendo porcentajes de degradación de hasta un 75,1% de petróleo crudo (1%, p/v), durante siete días de evaluación. Las células bacterianas que mostraron mejores resultados fueron las inmovilizadas en comparación con las de vida libre (16). Mientras que en Indonesia se caracterizó el aislamiento de cuatro cepas bacterianas termófilas, las colonias presentaban diferentes características fenotípicas, que fueron analizados por análisis microscópicos y bioquímicos (17).

También, se revelaron que seis géneros bacterianos con capacidad para degradar diésel, lograron niveles de entre 83 y 84 %, en 15 días de evaluación (18). De igual forma en el aislamiento de *Bacillus* sp. procedentes de aguas termales en la India, se pudo comprobar la tolerancia a temperaturas que van desde 50°C hasta 90°C. Las pruebas se realizaron mediante observación morfológica y pruebas bioquímicas. La tinción de Gram y caracterización microscópica reveló bacterias gram positivos que pueden presentar proteasas termoestables (19).

1.2. Bases teóricas

Los Consorcios microbianos

Los consorcios microbianos son asociados naturales de dos o más especies, las cuales actúan como una sola comunidad beneficiando cada uno de ellos de la actividad de los demás. Es decir, se trata de sistemas naturales en los que microorganismos de distintas especies, a menudo de distintos géneros, coexisten especialmente y cooperan, posibilitando así la supervivencia de todos ellos (20). Estos microorganismos son capaces de prosperar en la naturaleza en cualquier entorno, pudiendo ser encontrados en el agua en el suelo, productos alimenticios, etc.

Los Organismos extremófilos

Los extremófilos son organismos vivos que presentan la capacidad de sobrevivir en condiciones en las cuales, otros organismos no pueden desarrollarse, estos pueden ser ambientes con temperaturas extremadamente altas y bajas, pH extremadamente ácido o básico, entre otras condiciones. Dentro de estos organismos, las arqueobacterias son el grupo extremófilo más común debido a su gran versatilidad y comportamiento adaptativo. También las cianobacterias se adaptan a estas condiciones, siendo susceptibles pH bajo y zonas secas (21).

Los organismos extremófilos incluyen a las bacterias, procariotas, arqueas y organismos eucariotas. La gran mayoría de las arqueobacterias son extremófilas, toleran la sal, altas temperaturas, y los ambientes ácidos. Algunos géneros se los conoce como hipertermófilas, ya que toleran hasta 121°C de temperaturas, mientras que las bacterias *Geothermobacterium ferrireducens* pueden tolerar hasta 95 °C. En los multicelulares eucariotas, el cual incluye a los hongos pueden sobrevivir en condiciones extremas, prosperan en terrenos ácidos y alcalinos, toleran la sal y los metales,

pero son incapaces de tolerar altas temperaturas. Las especies de hongos *Exophiala* y *Cladophialophora* es capaz de obtener energía al metabolizar hidrocarburos y puede sobrevivir en lugares contaminados.

Los extremófilos son importantes para la biotecnología, debido a que ofrecen diversas aplicaciones basadas en producción de biomoléculas, como amilasa, celulasas, esterasas, queratinasas, lipasas, pectinasas, anticongelantes, proteínas, lípidos. Todos estos bioproductos son utilizados en la agricultura, las bebidas, los detergentes, alimentos, piensos, productos farmacéuticos, textiles, cuero, pasta y papel, etc. (22).

Los Hidrocarburos

La mayor cantidad de hidrocarburos naturales que existe en el mundo, se encuentran en forma de petróleo crudo, al cual la materia orgánica en descomposición le proporciona el carbono y el hidrógeno. Los hidrocarburos son compuestos orgánicos simples que contienen carbono e hidrógeno. Pueden ser de cadena lineal o ramificada. Existen hidrocarburos de bajo (metano, etano y propano) y alto peso molecular (eicosano, polietileno, polietileno y parafina), en el caso de los combustibles, el peso molecular de determinado por osmometría, punto de congelación, punto de ebullición, etc. (23).

Casi todos los hidrocarburos son combustibles, las propiedades químicas de los hidrocarburos nos muestran el potencial de sufrir cambios o reacciones químicas en función de su estructura, los cambios que sufre pueden cambiar totalmente al hidrocarburo de partida a excepción de la reacción de isomerización en la que está involucrado un hidrocarburo de cadena recta, convirtiéndose en una de cadena ramificada. En este caso la composición del producto no se modifica respecto a la composición del material de partida, sino solamente se modifica la estructura (24).

La Biodegradación de hidrocarburos

Los científicos vienen estudiando durante muchos años la biotransformación de los hidrocarburos mediante el uso de microorganismos. La evaluación de la transformación al que es sometido los componentes del petróleo en ambientes controlados conduce al aislamiento de las cepas microbianas individuales. Los análisis bioquímicos son importantes para identificar las transformaciones específicas y las enzimas responsables, del proceso de degradación. Además, los estudios genéticos para analizar la biotransformación y someter las células diferentes ensayos, ayuda a identificar su capacidad de degradación, el cual puede ser utilizado en el campo de la biorremediación.

Para la biorremediación existen varias estrategias. Por ejemplo, 1) la bioatenuación, mediante el cual los microbios autóctonos hacen limpieza sin intervención mínima, 2) la bioestimulación, consiste en la adición de nutrientes limitantes, 3) la bioaugmentación, en el que se inoculan cepas microbianas para acelerar la tasa de degradación del contaminante y 4) la bioadsorción, que es la captura del contaminante en la biomasa microbiana. Normalmente la mayoría de estos procesos, terminan en la mineralización o mitigación. Los ensayos pueden desarrollarse en la misma fuente del problema (In situ), o fuera de ella (Ex situ). Consecuentemente, la biorremediación puede ser de gran ayuda para resolver problemas de contaminación, pero es cierto que un escenario tan optimista no ocurre con mucha frecuencia (22).

Las Aguas termales

Los manantiales hidrotermales o geotérmicos, están formados por la aparición de aguas subterráneas calentadas geotérmicamente en la superficie de la tierra. El agua subterránea es calentada ya sea por cuerpos de magma pocos profundos o por la circulación de fallas hacia rocas calientes en lo profundo de la corteza terrestre. Las

aguas termales normalmente contienen grandes cantidades de minerales disueltos, el pH varía desde los más ácidos hasta los más alcalinos, muchos manantiales también contienen abundante hierro disuelto. Estos ambientes albergan diversas comunidades microbianas, debido a eso se los conoce también como las “selvas tropicales lluviosas” del mundo microbiano. Muchos de estos manantiales contienen los minerales que los depósitos epitermales subterráneos albergan (25).

1.3. Definición de términos básicos.

Aguas termales: son aguas calentadas por el calor geotérmico, el cual es generado en el interior de la tierra. Presentan temperaturas de al menos 4°C más altas que la temperatura media del lugar donde se encuentra geográficamente ubicada. Existen diferentes tipos, ya sea según su temperatura u origen. Según su temperatura; Frías, hipotermas, mesotermas e Hipertermas. Según su origen pueden clasificarse como telúricas y magmáticas (25).

Bacterias: son microorganismos que contiene una sola célula, miden aproximadamente de entre 0,5 y 5 µm, presentan diversas formas, que van desde cocos, bacilos, Vibrios, esperilos y espiroquetas (26).

Biodegradación: es la acción de descomponer una sustancia mediante la acción de organismos vivos (27).

Biorremediación: es una técnica que utiliza microorganismos, hongos plantas o enzimas derivadas de ellos para recuperar espacios contaminados (28).

Consortio microbiano: es la asociación natural de dos o más poblaciones microbianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad o un sistema complejo, donde todos se benefician de las actividades de los demás (29).

Curva de crecimiento: es un proceso de fisión binaria, que sufren las células y se multiplican. Esto aumentara de acuerdo a la disponibilidad de nutrientes que estas contengan. Tiene cuatro fases bien definidas: Latencia, Fase exponencial, Fase estacionaria, Fase de muerte (30).

Petróleo: también llamado petróleo crudo, es un combustible fósil, líquido de color negro o amarillento, se encuentra naturalmente en las formaciones geológicas. Se forma a partir del resultado de la descomposición de millones de años de plantas, algas y bacterias. El petróleo crudo está compuesto por varios hidrocarburos, entre ellos carbono (85%), hidrógeno (13%), oxígeno (1%), nitrógeno y azufre (0,5%) y metales como el hierro, níquel y cobre (0,1%) (31).

Tinción de gram: Es una prueba de laboratorio, que nos permite detectar bacterias en el microscopio por medio de un colorante (Tinción). La reacción se llevara a cabo según la distribución del peptidoglucano en la pared celular de las bacterias (32).

Capítulo II. Planteamiento del problema

2.1 Descripción del problema

Los niveles de contaminación ambiental en el mundo son alarmantes, los especialistas afirman que nuestro planeta se enfrenta a una triple emergencia medioambiental, el cual está ligada al cambio climático, la pérdida de la biodiversidad y la contaminación (33,34). La temperatura en la tierra se ha incrementado al menos 3 °C desde los niveles preindustriales, miles de especies de plantas y animales están en peligro de extinción, las enfermedades que son consecuencias de la contaminación causan millones de muertes prematuras cada año, además, la degradación ambiental impide el progreso e incrementa la pobreza y el hambre en la población (35).

Estos problemas no son ajenos en nuestro país, debido a la experiencia vivida con la pandemia, los problemas referentes al cambio climático, y el manejo de la contaminación, se ha incrementado (36). En la región Loreto, los datos no cambian mucho, la deforestación de los bosques, la minería ilegal y los derrames de petróleo, son los problemas que más afectan a la población. Contribuyendo a la aparición de enfermedades, disminución de los recursos de flora y fauna, y el incremento de la pobreza.

Si bien es cierto que históricamente nuestra región ha dependido económicamente de la extracción directa de sus recursos naturales, la exportación de madera y la explotación del petróleo son los que contribuyen significativamente a la economía regional, pero el costo beneficio que estas actividades generan es alto. Por ejemplo, los derrames de petróleo son una causa importante de contaminación de los suelos y ríos, por tanto, la contaminación de los peces y fauna silvestre, finalmente afecta a la población ribereña (37,38). Debido a estos problemas, es importante que la comunidad científica proponga alternativas eficientes y eco-amigables.

2.2. Formulación del problema

2.2.1. Problema general

¿Es posible obtener un consorcio microbiano biodegradador de petróleo a partir de las aguas termales de Contamana?

2.2.2. Problemas específicos

¿De acuerdo a la tinción Gram a que clases pertenecen las bacterias del consorcio microbiano biodegradador de petróleo obtenido a partir de las aguas termales de Contamana?

¿Cómo es el perfil de crecimiento del consorcio microbiano biodegradador de petróleo obtenido a partir de las aguas termales de Contamana?

¿Cuál es la capacidad biodegradadora de petróleo del consorcio microbiano obtenido a partir de las aguas termales de Contamana?

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo general

Obtener un consorcio microbiano biodegradador de petróleo a partir de las aguas termales de Contamana.

2.3.2. Objetivos específicos

Determinar de acuerdo a la tinción Gram a que clases pertenecen las bacterias del consorcio microbiano biodegradador de petróleo obtenido a partir de las aguas termales de Contamana.

Evaluar el perfil de crecimiento del consorcio microbiano biodegradador de petróleo obtenido a partir de las aguas termales de Contamana.

Estimar la capacidad biodegradadora de petróleo del consorcio microbiano obtenido a partir de las aguas termales de Contamana.

2.4. Hipótesis

El consorcio microbiano biodegradador de petróleo obtenido a partir de las aguas termales de Contamana está conformado por bacterias de las clases Gram positivas y Gram negativas, presentan un perfil de crecimiento típico y muestran capacidad para biodegradar el petróleo.

2.5. Variables

2.5.1. Identificación de las variables

2.5.1.1. Independiente (X)

Consortio microbiano biodegradador de petróleo

2.5.1.2. Dependiente (Y)

Clases de bacteria

Perfil de crecimiento

Capacidad para biodegradar el petróleo

2.5.2 Definición conceptual y operacional de las variables

- **Variable independiente**

 - **Consortio microbiano biodegradador de petróleo**

 - Son aquellos microorganismos que son capaces de biodegradar o catabolizar los hidrocarburos presentes en el petróleo.

- **Variable dependiente**

 - **Clase de bacteria**

 - Las bacterias son microorganismos procariotas que miden de entre 0,5 y 5 μm de longitud y presentan tres formas básicas distintas: esferas (cocos), bastones (bacilos), y espirales o

hélices (espiroquetas). No poseen núcleo definido, están conformados por una pared celular compuesta de peptidoglucano. De acuerdo a su tinción gran pueden pertenecer a las clases de bacterias gram positivas o gram negativas.

Perfil de crecimiento

El crecimiento bacteriano es el resultado de los procesos de división celular y muerte celular. Típicamente, consta de las siguientes fases: 1) adaptación (log), 2) exponencial, 3) estacionaria y 4) muerte celular. El crecimiento bacteriano se suele estimar mediante su absorbancia a 600nm.

Capacidad para biodegradar el petróleo

La capacidad de biodegradación de petróleo por el consorcio microbiano se evidencia por la transformación química de los hidrocarburos en polifenoles, estos últimos se pueden determinar mediante métodos colorimétricos estándares.

2.5.3. Operacionalización de las variables

VARIABLES	INDICADORES	INDICES	INSTRUMENTOS
Independiente (X)			
Consortio microbiano biodegradador de petróleo	Microorganismos presentes en los cultivos, visualizados mediante análisis microscópicos	Presencia o ausencia de bacterias	Microscopios binoculares
Dependiente (Y)			
Clase de bacteria	Gram positiva o Gram negativa	0 a 1000 por campo de lectura	Microscopios binoculares
Perfil de crecimiento	Absorbancia a 600nm	0 a 4 unidades de absorbancia	Espectrofotómetro NanoDrop 2000
Capacidad biodegradar petróleo	para el Concentración de polifenoles	0 a 0,1 µg/mL	Espectrofotómetro NanoDrop 2000

Capítulo III. Metodología

3.1. Tipo y diseño de la investigación

El diseño de la investigación fue de tipo experimental por que buscó evaluar la biodegradación de petróleo en muestras de aguas, procedentes de cuerpos de agua termales, de Contamana-Loreto. (Coordenadas geográficas: X=505294; Y=9203974,5).

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Estuvo constituido por todas las comunidades microbianas presente en los cuerpos de aguas termales.

3.2.2. Muestra

Estuvo conformada por la comunidad microbiana presente en un litro y medio de aguas termales.

3.3. Técnicas, instrumentos y procedimientos de recolección de datos

3.3.1. Técnica de recolección de datos

Las técnicas que se utilizaron a nivel de laboratorio para la recolección de datos fueron:

Cultivo. Se obtuvo un consorcio microbiano, para obtener la biomasa requerida para el proceso de biodegradación.

Evaluación. Se obtuvo un perfil microbiano, para ser utilizadas en los tratamientos de la fase experimental.

Observación. Se realizó diariamente al observar el crecimiento del consorcio microbiano y el monitoreo de la fase experimental.

Apuntes. Se realizó durante toda la fase experimental para anotar los resultados.

3.3.2. Instrumentos de recolección de datos

Los instrumentos para la recolección de datos que se utilizaron fueron los siguientes.

- a) Fichas o guías de información: Se utilizaron para registrar la información obtenida del crecimiento bacteriano.
- b) Claves taxonómicas: Se utilizaron para identificar a que especie pertenecen los microbios aislados.
- c) Equipos: Microscopio de fluorescencia (Zeiss, Lab-A1-Ax10), se utilizó para observar los microbios; Nanoespectrofotómetro (Thermo Scientific, NanoDrop® 2000), se utilizó para cuantificar el crecimiento celular.

3.3.3. Procedimiento de recolección de datos

Colecta de las muestras de aguas termales.

Se colectó 1,5 L de muestra de agua superficial, la muestra fue almacenada en frascos transparentes y transportados al Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú, donde fueron filtradas y sometidos a las condiciones de evaluación.

Aislamiento de las comunidades microbianas del cuerpo de agua termal.

Para el aislamiento de las comunidades microbianas, se utilizó 1,5 L de agua de 2 puntos de muestreo, Para ello se utilizó filtros acoplados de 200 μm , para atrapar la carga particulada de mayor tamaño. Se registraron los datos de pH, y temperatura de todas las muestras colectadas. Del total de agua colectada, se tomó 300 mL, El cual fue nuevamente filtrado en un dispositivo peristáltico (bombas de succión de agua y de vacío) (MILLIPORE WP6222050), el cual tuvo acoplado filtros de policarbonato de 0,22 μm – 47 mm, en

donde se atraparon los consorcios microbianos presentes en las muestras. Las células microbianas atrapadas fueron resuspendidas en medio de cultivo BH-7, luego fueron sometidas a los ensayos respectivos.

Cultivo del consorcio microbiano

Los cultivos de los consorcios microbianos, se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Para ello, se tomó 100 μ L del concentrado celular y se sembraron en 99,9 mL de medio de cultivo BH-7 al cual se le agregó 1 mL de petróleo crudo. Las muestras fueron cultivadas en un baño María (Tomos CDK-S12) a 50 °C durante 30 días. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, además, se tuvo un grupo control el cual contenía medio de cultivo + petróleo crudo.

Determinación de las clases de bacterias del consorcio microbiano

Para la determinación de los consorcios microbianos se utilizó la tinción de Gram y la tinción con bromuro de etidio (BrEt) (1mg/mL). Todas las muestras fueron observadas a 100 X, utilizando microscopio de fluorescencia (Zeiss, Lab-A1-Ax10), para la tinción de Gram, las muestras que se tiñeron de color azul fueron consideradas Gram positivas y las teñidas de color rojo fueron Gram negativas. En el caso de las teñidas con BrEt, se observaron si las células son teñidas de color rojo, el cual nos ayudó a determinar la presencia o ausencia de células bacterianas.

Este procedimiento se realizó tomando todas las medidas de bioseguridad necesarias.

Evaluación del perfil de crecimiento de los consorcios microbianos

Para evaluar el perfil de crecimiento se utilizó el Nanoespectrofotómetro (Thermo Scientific, NanoDrop® 2000), para ello se homogenizó la muestra completamente y se tomó 10 µL, con el cual se realizó la lectura de absorbancia a 600 nm. La evaluación se realizó cada 48 horas por treinta días.

Estimación de la capacidad de biodegradación de petróleo.

Se realizó mediante la cuantificación del contenido de polifenoles totales (TP), por medio del procedimiento de Folin-Ciocalteu, el cual consistió en agregar en una placa 20 µL DE Folin-Ciocalteu diluido (1:10 y/o 1:3), 100 µL de una solución de bicarbonato de sodio (20%) y 40 µL de agua destilada para completar un volumen final de 200 µL. Luego la solución se agitó y se dejó reposar durante 80 minutos, después se tomó 3 µL y con la ayuda de un NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific), se tomó los datos de la absorbancia a 765nm. La curva de calibración se realizó con soluciones de ácido gálico en concentraciones de 1, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/L. Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico equivalente (GAE) por litro.

3.4. Procesamiento y análisis de datos

Los datos generados fueron almacenados en una base de datos en Excel 2016. La prueba de distribución normal de los datos y los análisis estadísticos paramétricos y/o no paramétricos se realizaron con el software R v 4,0.

Capítulo IV. Resultados

4.1. Determinación por Tinción de Gram de clases bacterianas presentes en un consorcio microbiano biodegradador de petróleo obtenido a partir de las aguas termales de Contamana.

Las imágenes tomadas utilizando tinción de gram y observadas en un microscopio de fluorescencia a 100 X, nos muestra la presencia de bacterias gram positivas y gram negativas (Figura 1).

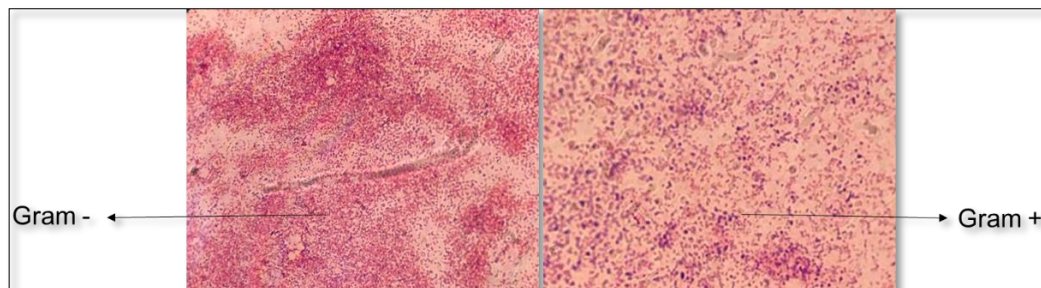


Figura 1. Celulas bacterianas observadas con tinción gram (Azules= Gram positivas; Rojas= Gram negativas), y observada bajo el microscopio de fluorescencia a 100 X.

Las formas bacterianas más comunes observadas fueron los cocos y cocobacilos, cabe mencionar que las células presentaron mayor densidad celular, durante los primeros diez días de evaluación.

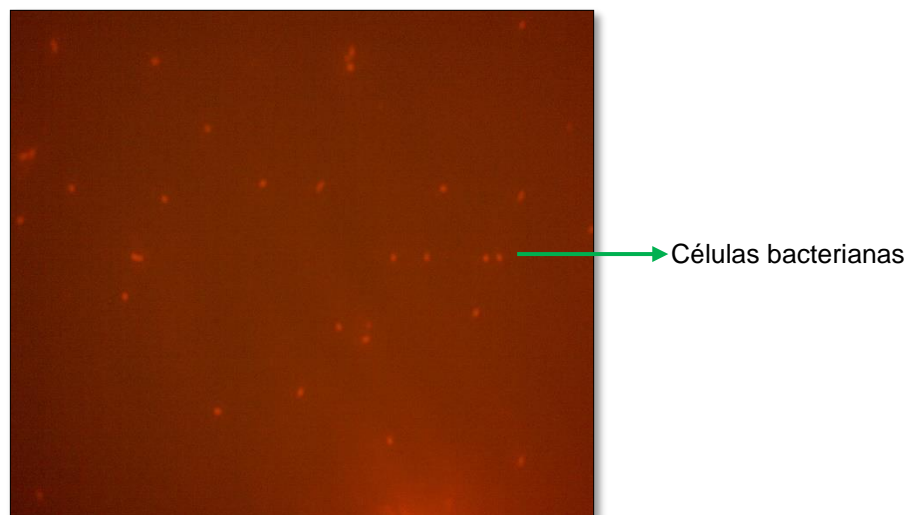


Figura 2. Células bacterianas observadas en microscopio a 100 X teñidas con bromuro de etidio.

4.2. Evaluación del perfil de crecimiento de un consorcio microbiano biodegradador de petróleo obtenido a partir de aguas termales de Contamana.

La evaluación del perfil de crecimiento del consorcio microbiano, nos mostró como resultado, un crecimiento gradual durante el desarrollo experimental de la investigación. Se puede evidenciar la adaptación y selección de los microorganismos capaces de sobrevivir a las condiciones de la evaluación. En él se puede observar que del día cero, hasta el segundo día, presentó la fase adaptativa, luego el crecimiento fue incrementándose gradualmente hasta llegar al día diez en el que tuvo el promedio de crecimiento más alto, teniendo valores superiores a 0,07 de absorbancia medido a 600 nm. mientras que el grupo control se mantuvo por debajo de 0,01 (Ver figura 3).

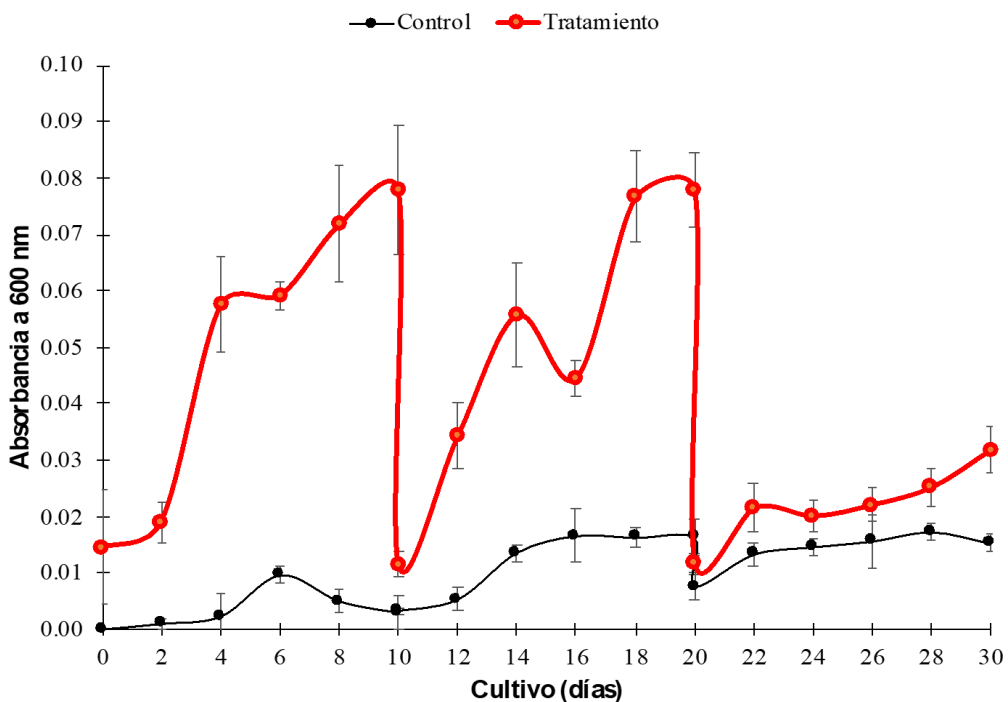


Figura 3. Perfil de crecimiento de consorcios microbianos expuestos a petróleo crudo durante treinta días de evaluación.

Posteriormente desde el día diez, en el que se realizó un subcultivo a los tratamientos, los valores fluctuaron de entre 0,01 hasta 0,08 de

absorbancia, respecto al grupo control que se mantuvo con valores inferiores 0,02. Finalmente, el crecimiento desde el día 20 hasta el día 30 presentó valores los valores más bajos, teniendo 0,03 como el nivel más alto en el último día, respecto al grupo control que se mantuvo por debajo de 0,02.

4.3. Estimación de la capacidad biodegradadora de petróleo utilizando un consorcio microbiano obtenido a partir de las aguas termales de Contamana.

La estimación de los niveles de biodegradación de los polifenoles totales, medido a 765 nm. de absorbancia, nos dió como resultado que la degradación de petróleo a los diez fue mayor, con un valor promedio superior a $40,20 \pm 8,89$ mg/L, mientras que a los veinte y treinta días, mostró resultados de $13,20 \pm 7,00 \pm 3,50$ y $14,70$ mg/L, respectivamente, (Ver tabla 1).

Tabla 1. Concentración de polifenoles obtenido durante los treinta días de evaluación.

Tiempo de cultivo (días)	Concentración de polifenoles (mg/L)	
	Promedio	DS
10	40.20	8.89
20	13.20	7.00
30	14.70	3.50

Los resultados de los últimos días de evaluación, nos muestra que existe microorganismos que lograron adaptarse a las condiciones de evaluación.

Capítulo V. Discusión, Conclusión y Recomendaciones

5.1. Discusión

El petróleo crudo y sus componentes son los combustibles que más se utilizan como fuente de energía en las industrias, los sistemas de transportes, y diversas actividades diarias que realiza el ser humano. El uso también supone un gran riesgo, que puede deberse al mal manejo o accidentes los cuales pueden causar derrames que provocan daños muy graves a los ecosistemas (39). Los consorcios microbianos son una buena alternativa, debido a que presentan mayor eficiencia que cepas bacterianas individuales, degradando los componentes de los hidrocarburos en suelos contaminados con mayor eficiencia (40).

Determinación por Tinción de Gram de clases bacterianas presentes en un consorcio microbiano degradador de petróleo obtenido a partir de las aguas termales de Contamana.

En nuestra investigación se pudo determinar que las muestras mostraron la presencia de células gram negativas y positivas, predominando las formas cocos y cocobacilos, estos resultados difieren a los obtenidos por Bekele *et al.*, (18), quienes lograron identificar 19 aislados bacterianos utilizando tinción de gram, sus resultados mostraron que más del 85 % de sus aislados fueron gram negativas y tenían formas de bacilos, mientras que un 15% eran bacilos gram positivos. Así mismo cuando se evaluó (7), el aislamiento de microorganismos procedentes de aguas termales y suelos de bosques de Contamana, se encontró principalmente bacilos gram positivos. De igual forma utilizando tinción gram encontraron 8 especies microbianas cuando evaluaron la microbiota de extremófilos (10). Así mismo, en el aislamiento de *Bacillus* sp. procedente de la India y aislada a temperaturas de entre 50°C hasta 90°C, la tinción de gram reveló que las muestras fueron gram positivas (19). Las observaciones microscópicas de aislados

bacterianos termófilas de fuentes aeróbicas en Indonesia, dieron como resultados que la mayoría fueron bacterias gram positivas (17).

Evaluación del perfil de crecimiento de un consorcio microbiano biodegradador de petróleo obtenido a partir de aguas termales de Contamana.

Respecto al perfil de crecimiento nuestros resultados muestran que fue gradual y que tuvo su máximo crecimiento en el día 20 de evaluación, con un valor de 0,078 nm. de absorbancia. Estos resultados son inferiores, a los reportados por investigadores en Asia, quienes obtuvieron valores superiores en el crecimiento logrando alcanzar datos de hasta 0,815 nm. de absorbancia a una densidad óptica de 600 nm, después de 23 días de evaluación (6). De igual forma, Manzur en el 2018 (5), obtuvo valores muchos más altos, que fueron desde 0,214 hasta 0,350 cuando evaluó el crecimiento de dos especies de microalgas sometidas a petróleo crudo, durante catorce días de evaluación.

Estimación de la capacidad biodegradadora de petróleo utilizando un consorcio microbiano obtenido a partir de las aguas termales de Contamana.

La estimación de la degradación de petróleo por medio de la cuantificación de los polifenoles totales nos indica que esta se llevó a cabo con mayor eficiencia durante los primeros diez días de evaluación. Estos resultados concuerdan con lo que obtuvieron investigadores al evaluar consorcios degradadores de petróleo aislados de respiradores hidrotermales en el cual lograron una reducción de hasta el 44,3 % de degradación de petróleo crudo (14). De igual forma el porcentaje de degradación de 50% de degradación en siete cepas bacterianas capaces de degradar sustratos contaminados con hidrocarburos (15). Así mismo un 75,1%, de degradación, se encontraron durante siete días de evaluación en consorcios bacterianos provenientes de fuentes marinas (16).

5.2. Conclusiones

- La tinción de gram nos permite identificar las clases bacterianas capaces de degradar hidrocarburos.
- El crecimiento bacteriano se incrementa de forma gradual y muestra mejores resultados durante los primeros días de evaluación.
- Los consorcios microbianos provenientes de aguas termales pueden degradar petróleo cuando presentan una mayor densidad celular.

5.3. Recomendaciones

- Se recomienda realizar más días de evaluación, con la finalidad de obtener una mejor curva de crecimiento. Además de realizar otras pruebas, que nos permitan obtener resultados más óptimos.
- Los consorcios microbianos deben presentar densidades celulares superiores a 10^4 , con la finalidad de obtener una mejor respuesta.
- Realizar ensayos con diferentes grados API (American Petroleum Instituto) de petróleo, con la finalidad de cuantificar los niveles de degradación que presentan después de ser sometidos a los consorcios bacterianos.
- Realizar pruebas de degradación insitu, de lugares contaminando por petróleo, considerando diferentes niveles de temperatura.

Referencias bibliográficas

1. Ławniczak Ł, Wozniak-Karczewska M, Loibner AP, Heipieper HJ, Chrzanowski Ł. Microbial Degradation of Hydrocarbons—Basic Principles for Bioremediation: A Review. 2020;19.
2. Lugo Mancilla LLL. Interpretación conceptual del estado actual de la biorremediación realizada por microorganismos sobre hidrocarburos aromáticos policíclicos derivados del petróleo [Magister en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente]. [Manizales]: Universidad de Manizales; 2017.
3. Gutiérrez Taipe KYR. Influencia de factores ambientales de crecimiento microbiano en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* en Huancayo [Internet] [Tesis para Optar el título Profesional De Ingeniero Ambiental]. [Huancayo]: Universidad Continental; 2018. Disponible en: <https://repositorio.continental.edu.pe/handle/20.500.12394/4507>
4. Konwar BK, Sagar K. Lipase: an industrial enzyme through metagenomics. Oakville; Watertown, NJ: Apple Academic Press; 2018. 214 p.
5. Manzur Rodriguez JP. Influencia del petróleo crudo en el crecimiento de dos microalgas amazónicas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp [Internet]. [Iquitos, Perú]: Universidad Científica del Perú; 2018. Disponible en: <http://repositorio.ucp.edu.pe/handle/UCP/487>
6. Godini K, Samarghandi MR, Zafari D, Rahmani AR, Afkhami A, Arabestani MR. Isolation and identification of new strains of crude oil degrading bacteria from Kharg Island, Iran. Pet Sci Technol. 18 de junio de 2018;36(12):869-74.
7. Cortez Camacho BY. Aislamiento de microorganismos productores de celulasas alcalinas de aguas termales y suelos de bosques de Contamana [Internet] [Para optar el título profesional de Biólogo]. [Iquitos-Perú]: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2015. Disponible en: <http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/20.500.12737/4124>
8. Soler JSA, Alcázar NR. Evaluación de la capacidad de biodegradación de diésel por células libres e inmovilizadas de *Chromobacterium violaceum*. 2020;139.
9. Paul S, Cortez Y, Vera N, Villena GK, Gutiérrez-Correa M. Metagenomic analysis of microbial community of an Amazonian geothermal spring in Peru. Genomics Data. 1 de septiembre de 2016;9:63-6.

10. Medina Ramírez G, Naranjo C, Escobar S, Araque J, Djabayan P, Andueza F. Microbiota extremófila y resistomas ambientales de la fuente termal “Termas La Merced” Quito-Ecuador. FIGEMPA Investig Desarro. 6 de diciembre de 2016;1(2):33-7.
11. Andueza F, Chaucala S, Vinueza R, Escobar S, Medina-Ramírez G. Calidad microbiológica de las aguas termales del balneario “El Tingo”. Pichincha. Ecuador. :9.
12. Gallut Rubio P. Aislamiento y cultivo de microorganismos asociados a oncoides de manantiales hidrotermales de Santispac, Bahía Concepción, B.C.S., México. 2016 [citado 12 de noviembre de 2021]; Disponible en: <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/548>
13. Bacosa HP, Kamalanathan M, Chiu MH, Tsai SM, Sun L, Labonté JM, et al. Extracellular polymeric substances (EPS) producing and oil degrading bacteria isolated from the northern Gulf of Mexico. PLOS ONE. 6 de diciembre de 2018;13(12):e0208406.
14. Ma M, Zheng L, Yin X, Gao W, Han B, Li Q, et al. Reconstruction and evaluation of oil-degrading consortia isolated from sediments of hydrothermal vents in the South Mid-Atlantic Ridge. Sci Rep. 14 de enero de 2021;11(1):1456.
15. Wang R, Wu B, Zheng J, Chen H, Rao P, Yan L, et al. Biodegradation of Total Petroleum Hydrocarbons in Soil: Isolation and Characterization of Bacterial Strains from Oil Contaminated Soil. Appl Sci. enero de 2020;10(12):4173.
16. Chen Q, Li J, Liu M, Sun H, Bao M. Study on the biodegradation of crude oil by free and immobilized bacterial consortium in marine environment. Arora PK, editor. PLOS ONE. 27 de marzo de 2017;12(3):e0174445.
17. Ifandi S, Alwi M. Isolation of Thermophilic Bacteria from Bora Hot Springs in Central Sulawesi. Biosaintifika J Biol Biol Educ. 29 de agosto de 2018;10:291-7.
18. Bekele GK, Gebrie SA, Mekonen E, Fida TT, Woldesemayat AA, Abda EM, et al. Isolation and Characterization of Diesel-Degrading Bacteria from Hydrocarbon-Contaminated Sites, Flower Farms, and Soda Lakes. Int J Microbiol. 21 de enero de 2022;2022:e5655767.
19. Panda MK, Sahu MK, Tayung K. Isolation and characterization of a thermophilic Bacillus sp. with protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. Iran J Microbiol. junio de 2013;5(2):159-65.
20. aligvil1. Consorcios microbianos y biotecnología / Microbial consortia and Biotechnology [Internet]. Biotechmind. 2015 [citado 17 de

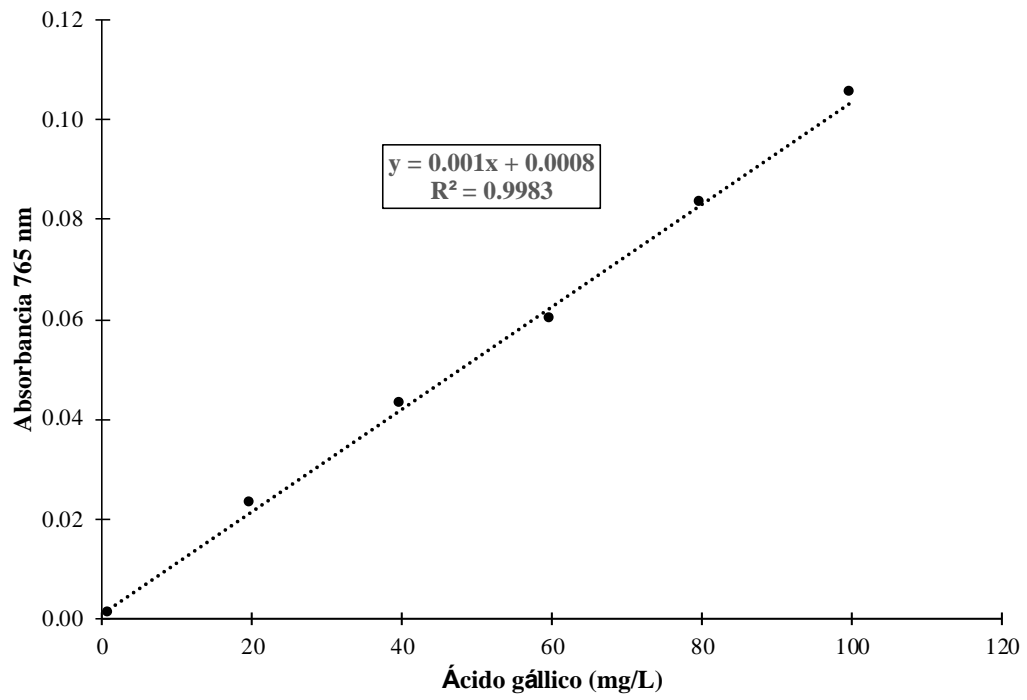
noviembre de 2021]. Disponible en: <https://biotechmind.wordpress.com/2015/11/11/microbial-consortia-biotech-consorcios-microbianos/>

21. Malavasi V, Soru S, Cao G. Extremophile Microalgae: the potential for biotechnological application. *J Phycol.* junio de 2020;56(3):559-73.
22. Steffan RJ, editor. *Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Biodegradation and Bioremediation* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-50433-9>
23. Sparkman OD, Penton ZE, Kitson FG. Hydrocarbons. En: *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide* [Internet]. Elsevier; 2011. p. 331-9. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123736284000216>
24. Speight JG. Chemical and Physical Properties of Hydrocarbons. En: *Handbook of Industrial Hydrocarbon Processes* [Internet]. Elsevier; 2011 [citado 13 de mayo de 2022]. p. 325-53. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978075068632710009X>
25. Des Marais DJ, Walter MR. Terrestrial Hot Spring Systems: Introduction. *Astrobiology.* 1 de diciembre de 2019;19(12):1419-32.
26. Simmons NA, editor. Chapter Two - The Biology of bacteria. En: *An Introduction to Microbiology for Nurses (Third Edition)* [Internet]. Butterworth-Heinemann; 1980. p. 6-19. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780433303015500060>
27. Asale, RAE. biodegradar | Diccionario de la lengua española [Internet]. «Diccionario de la lengua española» - Edición del Tricentenario. Disponible en: <https://dle.rae.es/biodegradar>
28. Megharaj M, Venkateswarlu K, Naidu R. Bioremediation. En: Wexler P, editor. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2014. p. 485-9. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123864543010010>
29. Ochoa Carreño DC, Montoya Restrepo A. Consorcios microbianos. Una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. *Rev Fac Cienc Económicas Investig Reflexión.* diciembre de 2010;18(2):55-74.
30. Desarrollo microbiano [Internet]. Ceupe. Disponible en: <https://www.ceupe.com/blog/desarrollo-microbiano.html>

31. Petroleum | National Geographic Society [Internet]. [citado 13 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.nationalgeographic.org/encyclopedia/petroleum/>
32. Tinción de Gram y tira reactiva como métodos diagnósticos de la infección del tracto urinario del lactante con fiebre - ScienceDirect. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1695403300774996>
33. Planelles M. El País. 2021 [citado 16 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://elpais.com/clima-y-medio-ambiente/2021-02-18/la-onu-alerta-de-una-triple-crisis-ambiental-en-el-planeta-calentamiento-perdida-de-biodiversidad-y-contaminacion.html>
34. Environment UN. UNEP Annual Report: Letter from the Executive Director - 2019 in review [Internet]. UNEP - UN Environment Programme. 2020. Disponible en: <https://www.unenvironment.org/annualreport/2019/index.php>
35. Kostova B. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente [Internet]. Naciones Unidas y el Estado de Derecho. Disponible en: <https://www.un.org/ruleoflaw/es/un-and-the-rule-of-law/united-nations-environment-programme/>
36. Los desafíos ambientales de Perú en el 2021 [Internet]. Noticias ambientales. 2021. Disponible en: <https://es.mongabay.com/2021/01/los-desafios-ambientales-para-el-peru-en-el-2021/>
37. Hausmann R, Santos MÁ, Muci F, Pye JT, Lu J. Diagnóstico de Crecimiento de Loreto: Principales Restricciones al Desarrollo Sostenible. :87.
38. Yusta-garcía R, Orta-Martinez M, Mayor P, Gonzalez-Crespo C, Rosell-Melé A. Water contamination from oil extraction activities in Northern Peruvian Amazonian rivers. Environ Pollut. 1 de abril de 2017;225.
39. Ebadi A, Ghavidel A, Khoshkholgh Sima NA, Heydari G, Ghaffari MR. New strategy to increase oil biodegradation efficiency by selecting isolates with diverse functionality and no antagonistic interactions for bacterial consortia. J Environ Chem Eng. 1 de octubre de 2021;9(5):106315.
40. Wu M, Chen L, Tian Y, Ding Y, Dick WA. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media. Environ Pollut. 1 de julio de 2013;178:152-8.

Anexos:

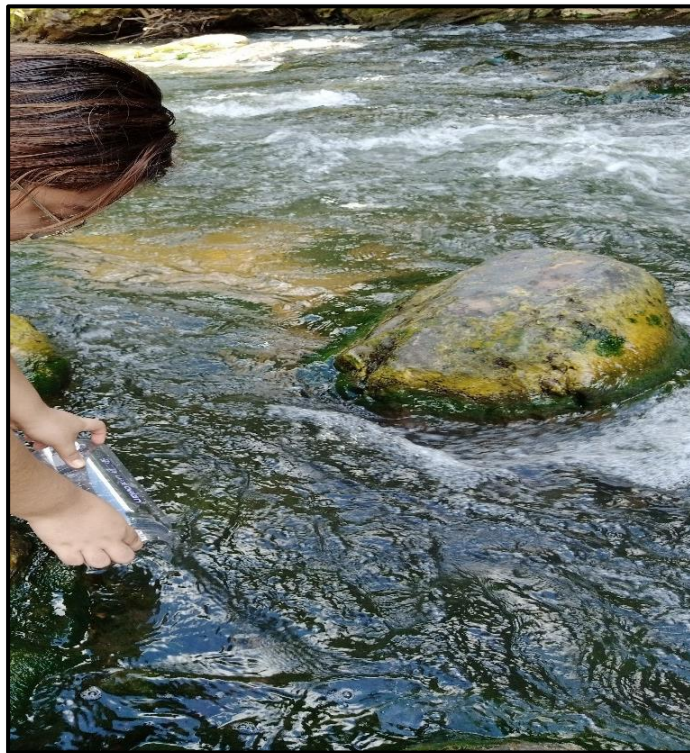
Curva estándar de ácido gálico utilizado para la cuantificación de la degradación de polifenoles.



Galería de fotos de procedimiento experimental de la tesis



Colecta de muestras



Colecta directa de la muestra



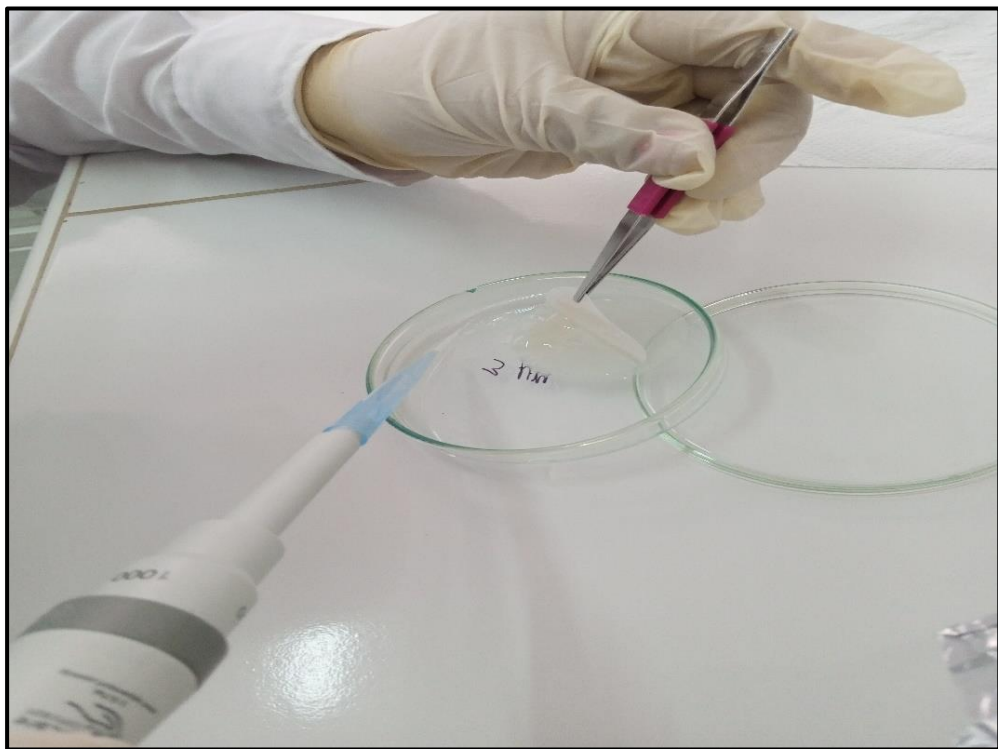
Filtración de muestras de agua



Proceso de filtración al vacío.



Células bacterianas atrapadas en filtros de 0,22 μm .



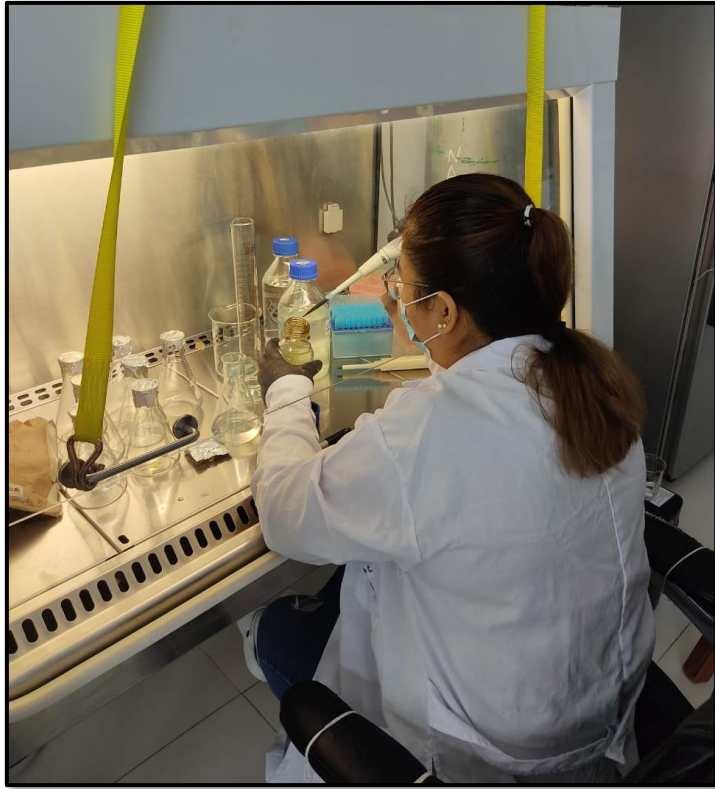
Recuperación de celulasa bacterianas atrapadas en filtros de 0,22 μm



Recuperación de células bacterianas por medio vortex



Recuperación de células Centrifugación



Preparación de los ensayos en matraces Erlenmeyer



Ensayo utilizando un baño María a 50°C.



Etapa de subcultivo a 10 días después de iniciado la evaluación



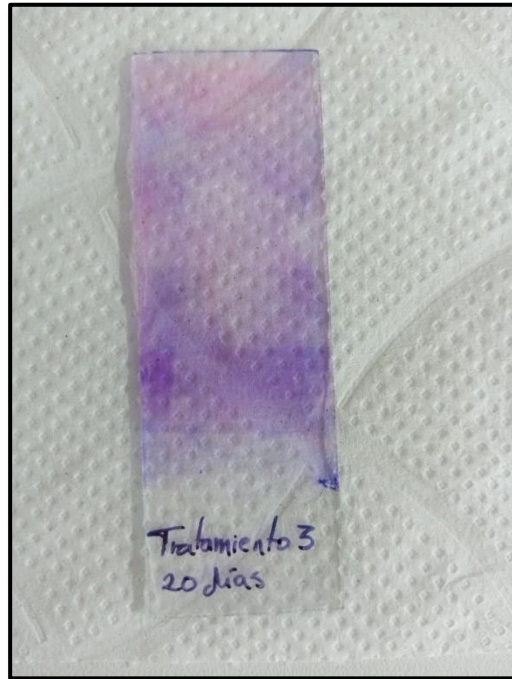
Evaluación del crecimiento bacteriano por espectrofotometría



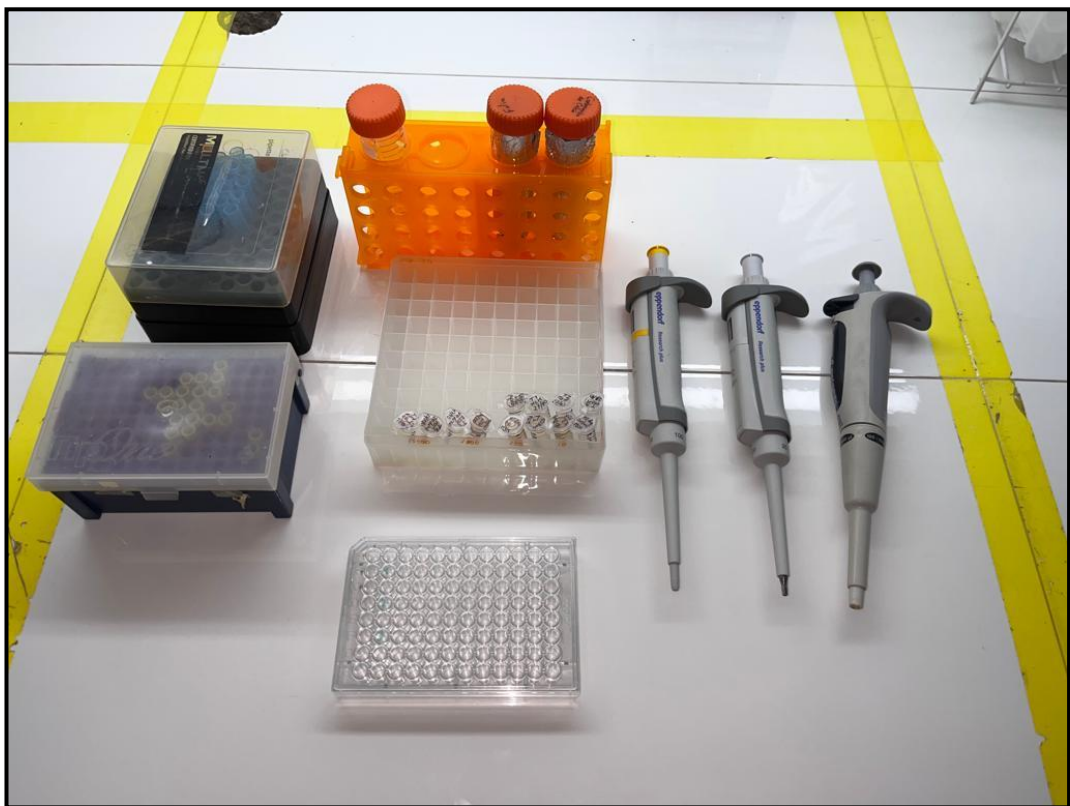
Tinción gram de las células bacterianas



Observación microscópica a 100 X de las células bacterianas



Lamina porta objeto mostrando coloración por tinción gram



Materiales utilizados para la evaluación de polifenoles



Proceso de evaluación de la cuantificación de los polifenoles