



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON
CAPACIDAD DE DEGRADAR HIDROCARBUROS EN SUELOS
CONTAMINADOS DE LA COMUNIDAD LUMBAQUI, PROVINCIA DE
SUCUMBÍOS



AUTOR

DANIELA CAROLINA NARANJO GONZÁLEZ

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON
CAPACIDAD DE DEGRADAR HIDROCARBUROS EN SUELOS
CONTAMINADOS DE LA COMUNIDAD LUMBAQUI, PROVINCIA DE
SUCUMBÍOS

Trabajo de Titulación presentado en la conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Tutor científico

M.Sc Miguel Ángel Gualoto PhD

Tutor guía

Blgo. Carlos Andrés Bastidas M.Sc

Autora

Daniela Carolina Naranjo González

Año

2017

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos.

Miguel Ángel Gualoto Oñate

Doctor en Bioquímica

CC.: 1707429351

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el (los) estudiante(s), orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Carlos Andrés Bastidas Caldés

Master en Microbiología

CC: 0201619806

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Laura Guerrero Latorre

Doctora en Microbiología Ambiental y Biotecnología

CC: 482851

DECLARACIÓN DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

Daniela Carolina Naranjo González

CC: 1722343074

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios, porque en el camino de este logro me demostró que sus tiempos son perfectos y me abrió las puertas indicadas.

A mis padres, Martha y Eduardo por el apoyo incondicional, por enseñarme a alcanzar mis metas sin rendirme, sobre todo por su esfuerzo para permitirme tener la oportunidad de estudiar. A mi hermana, Alejandra por darme fuerza y fe para creer en lo que me parecía imposible alcanzar.

A todos quienes me facilitaron equipos, reactivos y servicios para lograr avanzar y culminar con mi proyecto. Sobre todo a la carrera de Ambiental y carrera de Biotecnología.

DEDICATORIA

Se lo dedico a mi tutor científico, MsC Miguel Gualoto PhD, por su esfuerzo, dedicación, orientación, persistencia, paciencia y motivación. Él se ha ganado mi admiración y me quedo en deuda por todo lo recibido durante este periodo.

A mis padres, cuya inculcación de responsabilidad y éxito se ve reflejado en este texto. A mis sobrinos, Anna Paula y Eduardo quienes con paciencia y amor comprendieron el tiempo que no pude estar a su lado por darles el ejemplo de ser una mejor persona. A mi mejor amigo, Timothy por su amistad, cariño y sobre todo ejemplo de excelente estudiante y calidad de humano durante el transcurso de esta carrera juntos.

RESUMEN

A lo largo de la historia, el petróleo como hidrocarburo y como producto del proceso de refinación, ha generado alto impacto en el ambiente. El Ecuador es uno de los países con mayor contaminación ambiental por hidrocarburos, donde las provincias amazónicas son las más afectadas. Por ello, se hace imperioso el desarrollo de alternativas de tratamiento de suelos contaminados que sean sustentables, no invasivas o nocivas con la naturaleza y sobre todo eficientes, como es la biorremediación. Para el presente proyecto se empleó suelos contaminados con hidrocarburos de la Comunidad de Lumbaqui, con el fin de aislar bacterias autóctonas con capacidad de degradar hidrocarburos. Bajo condiciones controladas de laboratorio, se estudió la dinámica de crecimiento bacteriano, la cinética del proceso de degradación del hidrocarburo y se identificó las especies ensayadas. Estos parámetros se estudiaron en 2 etapas; un ensayo de turbidez donde se seleccionó las colonias bacterianas con mayor rendimiento en cuanto a tasa de crecimiento, y un ensayo de emisión de CO₂ donde se estableció la cinética de crecimiento y la tasa de degradación del hidrocarburo, por el método indirecto de la coloración de la fenoltaleína. A partir de los ensayos llevados a cabo, donde se empleó Gasolina Blanca (*Jet Fuel*), se consiguió aislar e identificar 3 distintas bacterias con capacidad de degradar este hidrocarburo, *Pseudomonas oleovorans*, *Bacillus sphaericus* y *Bacillus smithii*. Según los datos obtenidos se determinó que *P. oleovorans* presenta una mayor tasa de crecimiento respecto de *B.smithii* y *B.sphaericus* con un 20 % y 53 % más, respectivamente. Además se observó, que *P.oleovorans* y *B.smithii* tienen una tasa de degradación más eficiente a los 21 días (100 % de degradación), que *B. sphaericus* (94 % de degradación). Estas diferencias observadas no mostraron significancia estadística. Finalmente, se concluyó que las cepas bacterianas aisladas en Lumbaqui son capaces de crecer en un sustrato contaminado con hidrocarburo y degradarlo eficientemente. Adicionalmente, es recomendable llevar a cabo estudios con otro tipo de hidrocarburos, analizado la tolerancia, eficiencia de degradación y comportamiento en consorcio microbiano de las bacterias identificadas.

ABSTRACT

Throughout history, oil as a hydrocarbon and as a product of the refining process, has generated high impact on the environment. Ecuador is one of the countries with the highest environmental contamination by hydrocarbons, where the Amazon provinces are the most affected. Therefore, it is imperative to develop alternative treatment of contaminated soils that are sustainable, non-invasive or harmful to nature and especially efficient, such as bioremediation. For the present project soils contaminated with hydrocarbons of the Community of Lumbaqui were used, in order to isolate autochthonous bacteria with capacity to degrade hydrocarbons. Under controlled laboratory conditions, the bacterial growth dynamics, the kinetics of the hydrocarbon degradation process and the species tested were identified. These parameters were studied in 2 stages; a turbidity test where bacterial colonies with the highest growth rate yields were selected and a CO₂ emission test where the growth kinetics and the rate of hydrocarbon degradation were established by the indirect method of t phenolphthalein's coloration. From the tests carried out, where White Fuel (Jet Fuel) was used, it was possible to isolate and identify 3 different bacteria capable of degrading this hydrocarbon, *Pseudomonas oleovorans*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus smithii*. According to the data obtained it was determined that *P. oleovorans* presents a higher growth rate with respect to *B.smithii* and *B.sphaericus* with 20% and 53% more, respectively. It was also observed that *P.oleovorans* and *B.smithii* have a more efficient degradation rate at 21 days (100% degradation) than *B. sphaericus* (94% degradation). These observed differences did not show statistical significance. Finally, it was concluded that the bacterial strains isolated in Lumbaqui are able to grow in a substrate contaminated with hydrocarbon and to degrade it efficiently. In addition, it is advisable to carry out studies with other types of hydrocarbons, analyzing the tolerance, degradation efficiency and behavior in microbial consortium of the identified bacteria.

ÍNDICE

1. TÍTULO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL	1
2. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
2.1 Antecedentes	1
2.2 Planteamiento del Problema.....	3
2.3 Justificación	4
2.4 Objetivo general.....	5
2.4.1 Objetivos específicos	5
3. CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	6
3.1 Suelos	6
3.1.1 Propiedades físicas del suelo	6
3.1.2 Propiedades químicas	15
3.1.3 Propiedades biológicas.....	17
3.1.4 Tipos de suelo	20
3.2 Petróleo	21
3.2.1 Generalidades	21
3.2.2 Productos Derivados del Petróleo.....	21
3.2.2 Industria Hidrocarburífera en el Ecuador	24
3.2.3 Legislación Hidrocarburífera y Ámbito Ambiental	27
3.3 Impacto Ambiental	28
3.3.1 Impacto en el Suelo	32
3.3.2 Impacto en el Agua.....	34
3.3.3 Impacto en el Aire.....	35
3.4 Impacto Económico y Social.....	37
3.5 Impacto en el Ecuador	38
3.6 Remediación Ambiental	39
3.6.1 Clasificación de las técnicas de remediación.....	40
3.6.2 Factores que inciden en la Biorremediación	44
3.7 Uso de Microorganismos en Biorremediación	53
3.7.1 Sistemas de degradación de hidrocarburos alifáticos.....	54
3.8 Especies de microorganismos degradadores de hidrocarburos	56

3.8.1 Casos de estudio con determinadas especies de microorganismos degradadores de hidrocarburos en América Latina	56
3.8.2 Aplicación de microorganismos degradadores de hidrocarburos en Ecuador	58
4. CAPÍTULO III: DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL ..	61
5. CAPÍTULO IV: PROCEDIMIENTOS.....	64
5.1 Etapa 1: Determinación de la población y muestreo	64
5.2 Etapa 2: Aislamiento de bacterias e identificación morfológica	67
5.3 Etapa 3: Ensayo de turbidez.....	69
5.4 Etapa 4: Identificación de bacterias	70
5.5 Etapa 5: Tasa de crecimiento bacteriano y Tasa de degradación	71
5.6 Etapa 6: Estadística	75
6. CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	78
6.1 Etapa 2: Aislamiento de bacterias e identificación morfológica	78
6.2 Etapa 3: Ensayo de turbidez.....	79
6.3 Etapa 4: Identificación de bacterias	84
6.4 Etapa 5: Tasa de crecimiento bacteriano y Tasa de degradación	92
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	105
7.1 Conclusiones.....	105
7.2 Recomendaciones	106
8. REFERENCIAS.....	107
ANEXOS	123

1. TÍTULO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Aislamiento e identificación de microorganismos con capacidad de degradar hidrocarburos en suelos contaminados de la Comunidad Lumbaqui, provincia de Sucumbíos

2. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

2.1 Antecedentes

El petróleo crudo es una mezcla compuesta conformada en su mayoría por una parte orgánica de hidrocarburos y por otra parte inorgánica de derivados sulfurados, nitrogenados y oxigenados (Rojas, 2014). A lo largo de la historia el petróleo como hidrocarburo y como producto del proceso de refinación ha generado alto impacto en el ambiente (Zamora, Ramos, & Arias, 2012, págs. 5-6).

El proceso de combustión genera contaminación ambiental de carácter difuso, el material particulado de su combustión, se deposita en la superficie de plantas, aguas, sedimentos y suelos o a través de las precipitaciones lixivia a niveles freáticos, de igual forma las actividades de producción y transporte, industrialización y comercialización generan impactos similares (Llató, 2012, págs. 20-22).

El petróleo libera gases tipo invernadero tales como metano, gas sulfhídrico, monóxido de carbono y mercaptanos, así Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's), que poseen propiedades tóxicas, mutagénicas y cancerígenas (MCA-UGT Federación de Industria, 2010, págs. 15-16, 25). Adicionalmente, son considerados causantes del perjuicio sostenido y progresivo de la diversidad de flora y fauna de los ecosistemas y de la pérdida de rendimiento en suelos por variaciones en sus propiedades físico-químicas (GreenPeace, 2012).

A estas causales de contaminación se suman las fugas de hidrocarburos de tanques de almacenamiento subterráneo, derrames generados por accidentes durante el transporte o roturas de los oleoductos y poliductos, etc. (Paria, 2008, págs. 25-26). Todos estos son considerados las principales fuentes de contaminación de ambientes terrestres y acuáticos que generan desequilibrios en los ecosistemas y pérdidas de la biodiversidad (Zamora, Ramos, & Arias, 2012, págs. 5-6).

Los derrames de hidrocarburos en el suelo, generan grandes cambios en la dinámica, diversidad, fisiología y bioquímica de los microorganismos edáficos, quienes o se adaptan a las nuevas condiciones o mueren. Son estos cambios metabólicos los que se han convertido en gran fuente de interés para la investigación ambiental (Llató, 2012, págs. 30-31).

El avance de la tecnología ha permitido desarrollar técnicas de remediación de suelos contaminados, que incluyen procedimientos físicos, químicos y biológicos. Entre las técnicas físico-químicas más comunes están la remoción mecánica, evaporación, dispersión, lavado y enterrado. A pesar de su variedad son calificadas como tecnologías caras, laboriosas e ineficientes, pues en muchas la descomposición de contaminantes es incompleta (Gouda, Omar, Nour, & Checkroud, 2009, págs. 1451-1452) .

Dentro de las tecnologías calificadas como amigables con el ambiente, ha surgido la biorremediación como una alternativa que emplea la actividad biológica de los microorganismos (Villegas, Martínez, Rodríguez, & Amoroso, 2014, pág. 135). La biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos se basa en la búsqueda de microorganismos, especialmente actinomicetos, hongos y bacterias, que degraden hidrocarburos, tanto alifáticos, ramificados, cíclicos y aromáticos policíclicos.

Los trabajos de biorremediación requieren de fuentes de financiamiento para su implementación efectiva, además del desarrollo de programas a gran escala y

tecnologías económicas eficientes. Los países en vías de desarrollo y subdesarrollados, enfrentan serios problemas en su implementación, razón por la que los problemas de contaminación ambiental se agravan día a día (Villegas, Martínez, Rodríguez, & Amoroso, 2014, pág. 136).

En América Latina, países como Perú, Guatemala, Chile y Ecuador se ha reportado el uso de técnicas de remediación biológicas a escala piloto. La divulgación de los trabajos de biorremediación ejecutados en Ecuador es muy escasa, pese a que, varias entidades se han unido a los planes nacionales de recuperación de zonas contaminadas con hidrocarburos empleando técnicas remediación (Ecuambiente Consulting Group, 2010).

2.2 Planteamiento del Problema

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos de alto impacto a nivel mundial en el ámbito social, económico y ambiental. Las sociedades modernas continúan dependiendo y confiando en los productos basados en petróleo, ya que son la mayor fuente de energía y materia prima de las industrias. Por ello, la necesidad en su exploración, extracción, producción, refinación, transporte y almacenamiento (Zawierucha & Grzegorz, 2011, pág. 187). Durante estas operaciones, se han generado fugas y derrames accidentales en diversos ambientes, convirtiendo al petróleo en una de sus principales causas de contaminación a nivel mundial (Nilanjana & Preethy, 2010, págs. 1-2).

Varios procesos físicos y químicos han sido desarrollados y empleados para remediaciones efectivas de hidrocarburos en suelos contaminados. Sin embargo, muchas de estas tecnologías son caras, los bioproductos formados traen contaminación secundaria y muchas veces se necesita de post tratamientos adicionales (Liang, Zhang, Dai, & Li, 2009, págs. 80-81), requieren monitoreo y control continuo y no siempre resultan en una degradación completa (Gouda, Omar, Nour, & Checkroud, 2009, págs. 1451-1453).

En el Ecuador el estudio de alternativas más amigables de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos, como la biorremediación que es un proceso de tratamiento biológico que usa el potencial microbiológico, no han sido desarrollados a plenitud. Esto debido a varios factores: falta de regulaciones claras, ausencia de normativas de bioseguridad para condiciones de campo, y/o poco conocimiento de la ecología microbiana local. Por consiguiente, la ausencia de estos estudios impide el desarrollo y uso de soluciones de remediación, imposibilitando la reducción de la contaminación hidrocarburífera, con la consecuente pérdida de biodiversidad y nichos ecológicos, y descontento social.

2.3 Justificación

El Ecuador es uno de los países con mayor contaminación ambiental por hidrocarburos, donde las provincias amazónicas son las más afectadas (Cely, 2013). Luego de una larga ausencia del estado, en el 2000, se aprobó finalmente la Ley Ambiental. Y en el año 2001, en el gobierno del Doctor Gustavo Noboa Bejarano, se aprobó el Decreto ejecutivo 1215, conocida como la Ley de Hidrocarburos y vigente hasta la actualidad. En esta se ha establecido los límites de emisiones para las distintas etapas operativas de la actividad hidrocarburífera, incluyendo para los trabajos de remediación y biorremediación (Decreto Ejecutivo 1215, Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas).

Con el propósito de dar cumplimiento a las normativas de esta ley, se hace imperioso el desarrollo de tecnologías de remediación y biorremediación de espacios contaminados, sustentables desde el punto de vista, técnico, económico, social y ambiental; que resulten no invasivas o nocivas con la naturaleza y sobre todo eficientes (Nilanjana & Preethy, 2010, págs. 1-2).

En el país, no se tienen reportes claros, en relación a microorganismos aislados e identificados de suelos amazónicos, con capacidad de degradar

hidrocarburos que se estén empleando masivamente en trabajos de biorremediación. De ahí que, la realización de ensayos de aislamiento, identificación y de degradación de hidrocarburos con microorganismos locales, constituye una verdadera alternativa para la resolución de la creciente tasa de contaminación edáfica por hidrocarburos en el Ecuador (Beristaín, 2009).

El estudio de su dinámica de crecimiento, la cinética del proceso de degradación bajo condiciones controladas de laboratorio, permitiría disponer un avance en el estudio de un consorcio microbiano capaz de ser estudiado y empleado en trabajos de remediación en la Comunidad de Lumbaqui, Cantón Gonzalo Pizarro, Provincia de Sucumbíos, y en todo el distrito amazónico ampliamente afectado por contaminación hidrocarburífera.

2.4 Objetivo general

Determinar microorganismos con potencial para degradar hidrocarburos en suelos contaminados de la Comunidad Lumbaqui, Provincia de Sucumbíos.

2.4.1 Objetivos específicos

- Identificar microorganismos con potencial capacidad de degradar hidrocarburos mediante un sistema de pruebas de degradación y pruebas bioquímicas.
- Establecer la cinética de degradación de hidrocarburos de los microorganismos identificados mediante curvas estadísticas de eficiencia de degradación obtenidas a partir de pruebas de degradación.

3. CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

3.1 Suelos

El suelo es uno de los sistemas naturales más complejos, este se basa en la interacción de organismos y minerales, los mismos que generan alta diversidad y complejidad estructural. El suelo está principalmente compuesto de minerales, materia orgánica, aire, agua y organismos vegetales y animales. La composición de minerales y organismos, el clima y la naturaleza de material orgánico, entre otros factores, determinan las características del suelo (Havlicek & Mitchell, 2014, pág. 27).

3.1.1 Propiedades físicas del suelo

Las propiedades físicas del suelo guardan relación con su estructura, textura, color, porosidad, humedad, temperatura, densidad y drenaje. Las mismas que son evaluadas a través de magnitudes físicas internacionales que permiten la caracterización de cada una de ellas. A continuación, se describe ciertas propiedades físicas del suelo con mayor relevancia:

3.1.1.1 Estructura del suelo

Esta propiedad se define como la forma en la que las partículas que componen el suelo se agrupan formando los denominados agregados o peds. La estructura es un factor en el suelo que afecta a otras propiedades físicas como la aireación, movimiento del agua y conducción térmica (Jonge, 2009, págs. 1-2).

Además, se sabe que el componente primordial que afecta la estructura del suelo es el agua, siendo esta estudiada como la capacidad de campo (McCauley, Jones, & Jacobsen, 2005, págs. 3-4). Así mismo, la materia

orgánica también es una característica que establece la estructura y textura del suelo (Fenton, Albers, & Katterings, 2008, págs. 1-2).

La estructura del suelo se puede definir de acuerdo al grado de estructura, la clase de estructura y el tipo de estructura, es decir, de acuerdo al comportamiento de los agregados, dependiendo del tamaño de agregado, y en base a la forma del agregado, respectivamente.

3.1.1.1.1 Comportamiento de los agregados

Esta clasificación se basa en la fuerza de agregación de los peds basada en las propiedades de cohesión y adhesión de estos. Por ello, la definición del tipo de comportamiento de los agregados no es adecuado realizarlo cuando existe exceso de humedad o sequía (Nimmo J. , 2004). Existen cuatro tipos de comportamiento de los agregados, mencionados a continuación:

- a. **Sin estructura:** Esto se presenta cuando los agregados no son visibles o no poseen un ordenamiento natural, por lo que o bien forman estructura de aglomerado o de grano simple.
- b. **Estructura débil:** Se basa en una mezcla de aglomeración quebradiza y poco agregada de los peds.
- c. **Estructura moderada:** Es un comportamiento con agregados regulares y formados, pero además son visiblemente enteros y rotos.
- d. **Estructura fuerte:** Presentan agregados muy bien formados y duraderos, son enteros y no existe presencia de material quebradizo o no agregado (Nimmo J. , 2004, págs. 1-2).

3.1.1.1.2 Tamaño de los agregados

Dentro de esta clasificación de la estructura, se debe mencionar que su fundamento se basa en el las dimensiones de los agregados individuales, así

las clases de estructuras de suelo basadas en el tamaño de los agregados son cinco básicamente: muy fina, fina, mediana, gruesa y muy gruesa (Rucks, García, Kaplán, Ponce de León, & Hill, 2004, págs. 1-2) .

3.1.1.1.3 Forma de los agregados

La configuración de los agregados, conocida como la forma estructural, permite describir cuatro tipos de estructura del suelo:

- a. **Estructura granular:** Se basa en una agrupación de los tres tipos de partículas del suelo (arena, arcilla y limo) en forma de granos casi esféricos de pequeño tamaño.
- b. **Estructura en bloque:** Las partículas del suelo generan una agrupación cuadrada de bordes pronunciados, este tipo de forma soporta el drenaje del agua.
- c. **Estructura en columna:** Este tipo de estructura de forma cuando existe un agrietamiento. Aunque a veces tenue, que genera pilares separados en formas de columnas.
- d. **Estructura laminar:** Es el apilamiento vertical y solapamiento de láminas de suelos, que son capas formadas por la agregación horizontal de las partículas (Rucks, García, Kaplán, Ponce de León, & Hill, 2004, págs. 13-15).

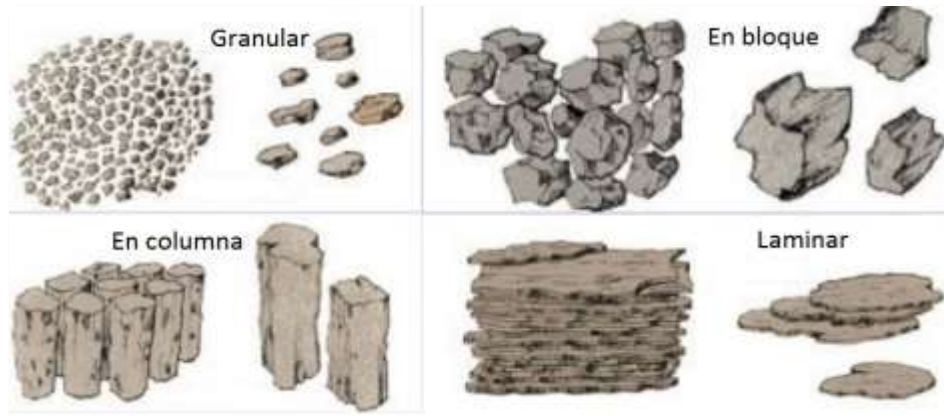


Figura 1. Estructura del Suelo.
Recuperado de Vera, A (2014).

3.1.1.1 Textura del Suelo

Esta propiedad hace referencia al tamaño de partículas que componen un suelo determinado. El tamaño de partícula permite clasificar al suelo en 3 tipos: arenoso, arcilloso y limo. Dependiendo del tipo de partícula la lixiviación y aireación del suelo se verán afectadas (McCauley, Jones, & Jacobsen, 2005, pág. 2).

3.1.1.1.1 Arenoso

Estos suelos se caracterizan por una composición de partículas grandes entre 0.05 – 2 mm de diámetro, es decir, de textura granular. Además, son a menudo secos y ligeros, deficientes en la retención de macro y micronutrientes, escasos en coloides minerales y orgánicos, de rápido drenaje lo que implica baja retención de agua, con alta porosidad y profundidad, y en su mayoría alcalinos. Estas características lo hacen más propenso a la erosión por agua y aire. Por ello, la disponibilidad de nutrientes y déficit en la retención de agua de los suelos de arena se puede mejorar a través de la adición de materia orgánica (Weber, y otros, 2007, pág. 1294).



Figura 2. Suelo Arenoso.

Recuperado de MasTiposde, Equipo de redacción (2016).

3.1.1.1.2 Arcilloso

Este tipo de suelo está formado por partículas muy pequeñas y compactas, de máximo 0.002 mm de diámetro. Así, podemos encontrar tres tipos de suelos arcillosos dependiendo del porcentaje de arcilla que cada uno dispone.

- a. **Suelo arcilloso (10 – 25 % arcilla)**, que se caracterizan por formar una capa superficial, como corteza en forma de costra, la misma que debe ser rota. Además, se caracteriza por bajo contenido de materia orgánica y escasa formación de agregados estructurales.
- b. **Suelo arcilloso (25 – 45% arcilla)**, tienen un drenaje de agua relativamente bueno pero lento, su agregación es diferente al resto de suelo arcillosos por lo que no forman un corteza en forma de costra, y tiene una tonalidad oscura.
- c. **Suelo arcilloso (40% arcilla)**, por lo general se componen de la denominada arcilla pesada, tiene alta capacidad de retención de agua pero provoca baja disponibilidad de esta para los organismos existentes, y su contenido de humus es mayor (Foley, 2016, págs. 1-2) .



Figura 3. Suelo Arcilloso.

Recuperado de MasTiposde, Equipo de redacción (2016).

3.1.1.1.3 Limoso o Humífero

El limo es un material granular de tamaño entre la arena y la arcilla, por ello este tipo de suelos se componen de partículas finas, de entre 0.002 – 0.005 mm. Su textura provoca que se tienda a formar endurecimiento de la corteza en forma de costra. Cuando el limo es seco tiene una estructura arenosa poco compacta, pero por lo general es pegajoso y resbaladizo por la presencia de humedad y poca capacidad de drenar el agua. Los suelos de limo son más fértiles que otros tipos de suelos ya que favorecen la retención de agua y una buena aireación.



Figura 4. Suelo Humífero.

Recuperado de MasTiposde, Equipo de redacción (2016).

Así, de acuerdo al porcentaje de distribución de las partículas (arena, arcillosa o limo), se ha realizado una clasificación del suelo más detallada en base a los tipos de textura del suelo. A continuación en la *Figura 5* se muestra la misma.

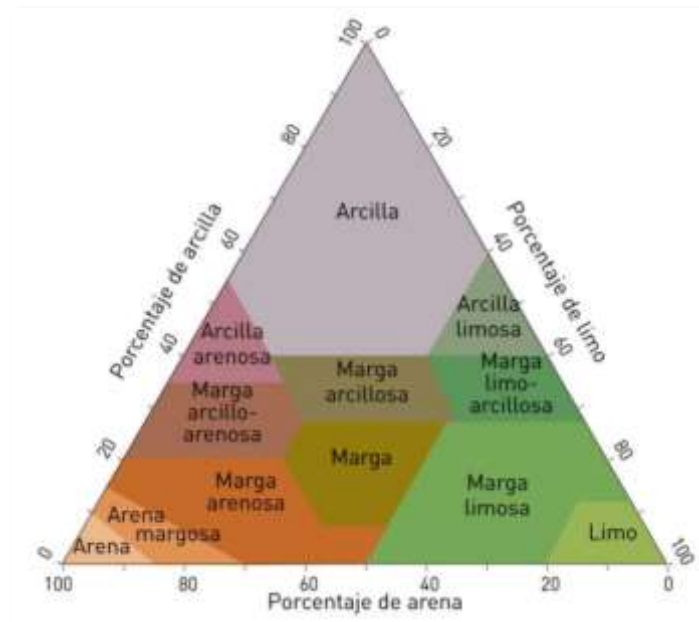


Figura 5. Pirámide de la Textura del Suelo.

Recuperado de FAO (2013).

3.1.1.2 Color

Esta propiedad depende específicamente de los componentes del suelo, es decir, dependiendo del contenido de materia orgánica o inorgánica el suelo adoptará un color significativo. Además, se sabe que el color es un factor que se emplea como un parámetro indirecto de descripción de otras propiedades como humedad y aireación (Rucks, García, Kaplán, Ponce de León, & Hill, 2004, pág. 54).

Dentro de los colores característicos de los suelos tenemos los siguientes: coloración roja que implica un suelo compuesto por manganeso u óxidos de hierro y aluminio, coloración amarilla que se basa en una composición de óxidos de hierro hidratados, coloración negra o marrón que indican existencia

de un alto contenido de materia orgánica y coloración blanca o grisácea que muestra la presencia de yeso, cuarzo, carbonatos, arcillas silicatadas (Rucks, García, Kaplán, Ponce de León, & Hill, 2004, págs. 55-56).

3.1.1.3 Porosidad

La porosidad es una propiedad que hace referencia a la existencia de espacios vacíos denominados poros dentro de un sistema estructural. Entonces, desde luego la porosidad es una consecuencia de la textura y estructura del suelo (Nimmo J. , 2004, págs. 295-296).

Existen dos tipos de poros que se pueden presentar en el suelo, macroscópicos y microscópicos. Un poro macroscópico se basa en una dimensión notable que permite su almacenamiento de aire, aquí el agua traspasa con gran rapidez y fuerza a través de ellos. Mientras, un poro microscópico está compuesto de agua retenida por la fuerza capilar que se genera (Nimmo J. , 2004, págs. 295-296).

3.1.1.4 Permeabilidad

Es una propiedad que guarda relación con el tamaño de los poros en el suelo, pues de esto depende la filtración o percolación del agua en el suelo, y la transmisión del aire. El tamaño de los poros y la cantidad de estos provocan la variación en la permeabilidad, lo que hace que depende de la estructura y textura del suelo. Es una propiedad que se puede medir de acuerdo a la conductividad hidráulica, es decir, la posibilidad de movimiento del agua dentro del suelo (Malinverno, 2008, págs. 11-12).

Se sabe que la permeabilidad de un suelo aumenta cuando la estructura contiene grietas o aberturas, es decir, de estructura frágil y quebradiza en cuanto a su agregación. Tiene mayor permeabilidad un suelo de tipo grava,

mientras los arenosos o rococós son semi permeables, y los arcillosos son muy poco permeables (Malinverno, 2008, págs. 11-12).

3.1.1.5 Drenaje

Esta propiedad conocida también como la remoción de fluidos (principalmente agua) en exceso por medios naturales o artificiales, el mismo que se da de manera superficial o vertical. El drenaje guarda relación con la permeabilidad y transmisibilidad que tiene el suelo, lo que indica que la estructura y la textura son factores que interfieren en el proceso de circulación del agua (Osman, 2013, págs. 85-86).

También se conoce que existen dos procesos de drenaje que facilitan la remoción del agua en el suelo, haciéndolo un proceso rápido, estos son el escurrimiento superficial y la infiltración profunda (Osman, 2013, págs. 85-86).

3.1.1.6 Capacidad de campo

La capacidad de campo está definida como la cantidad de agua que el suelo es capaz de retener una vez permitido el drenaje posterior a su saturación, evitando la evapotranspiración y estabilizando el potencial hídrico. Así, esta característica se verá mayormente afectada por la textura del suelo (McCauley, Jones, & Jacobsen, 2005, págs. 3-4).

Dentro de este parámetro está la actividad acuosa del suelo, en donde se establece que las condiciones óptimas para que los microorganismos actúen es que el porcentaje de saturación del agua esté entre un 38 – 81 %. La actividad acuosa no solo da paso a la disponibilidad de agua sino también de oxígeno (McCauley, Jones, & Jacobsen, 2005, págs. 3-4).

3.1.1.7 Humedad

La humedad en el suelo es la propiedad que representa al agua en el suelo, es decir, la cantidad que esta ocupa en la composición del suelo. Así también, la humedad depende de la textura y la materia orgánica específicamente. En cuanto a la textura, las partículas finas retienen con mayor fuerza la humedad en el suelo debido a su presencia de micro poros que generan tensiones de las capas del suelo. Mientras, una textura de partículas gruesas impide la retención de humedad ya que sus grandes poros agilitan y facilitan la filtración de fluidos (Osman, 2013, págs. 62-63).

La humedad es un factor relevante en el suelo, pues determina la formación, fertilidad, conservación, productividad del suelo, es decir, su comportamiento general como ecosistema. Pero, también cabe mencionar que existen factores externos que influyen en el contenido de humedad del suelo, como por ejemplo, el clima, la topografía, cobertura el suelo, etc. (Osman, 2013, págs. 62-63)

3.1.2 Propiedades químicas

Estas propiedades son aquellas que hacen referencia al contenido de sustancias en el suelo, como son los micronutrientes o macronutrientes, y su comportamiento y determinación de ciertas características del suelo. A través de estas propiedades se pueden conocer los cambios químicos que se producen en el suelo gracias a las reacciones químicas o interacciones que ocurran intrínsecamente. A continuación, se describen las principales propiedades químicas del suelo:

3.1.2.1 Potencial de hidrogeno (pH)

El pH es una propiedad que permite determinar el grado de adsorción de las partículas del suelo en cuanto a iones de hidrógeno, indicando así si el suelo es

de carácter básico o ácido. Además, es un parámetro variables en el suelo el cual afecta a varios procesos químicas de los que los organismos vivos son dependientes. Por ejemplo, afecta a la disponibilidad nutricional al que deben acceder las plantas a través del suelo (Lake, 2012, pág. 1 y 3).

Se conoce que el pH del suelo oscila entre las medidas de 3,5 y 9,5. Un suelo cuyo pH sobrepasa los 8,5 es un suelo alcalino que tiende a dispersarse, mientras un suelo con pH menos a 5,5, presenta cantidades toxicas de manganeso y aluminio (Lake, 2012, pág. 4).

3.1.2.2 Salinización

Con el término salinización se hace referencia al proceso de retención de sales en agua del suelo. Las sales más comunes en retenerse son iones de carga positiva como magnesio, calcio, potasio y sodio, pero también existen iones de carga negativa como los cloruros, carbonatos y sulfatos. Además, se considera que es un proceso que sucede cuando hay inadecuado control del drenaje y lixiviación del suelo (Panagea, Daliakopoulos, Tsanis, & Schwilch, 2016, págs. 1-2).

Este fenómeno ocurre cuando las sales solubles se encuentran en estado freático salino y por medio del agua se transportan a la superficie. Una vez que sucede esto el agua se evapora y por consiguiente las sales se acumulan en la capa superficial del suelo, generando salinidad excesiva y desgaste del suelo (Panagea, Daliakopoulos, Tsanis, & Schwilch, 2016, págs. 1-2).

3.1.2.3 Alcalinización

La alcalinización es una propiedad química que se usa específicamente para considerar la acumulación de sodio en el suelo. Lo que sucede es que a medida que aumenta la concentración de este catión intercambiable se remplazan otros iones del suelo (Merry, 2013, págs. 16-17).

Esto se da con mayor frecuencia en suelos áridos, por lo que su escasez en propiedades físicas y biológicas es evidente. Con la alcalinización se ven afectadas propiedades como drenaje, percolación e infiltración (Merry, 2013, págs. 16-17).

3.1.2.4 Capacidad de intercambio iónico

El intercambio iónico del suelo se refiere a la absorción de iones a través de procesos reversibles. Las partículas sólidas toman elementos esenciales de la fase acuosa y liberan cantidades de iones equivalentes que mantengan el equilibrio de intercambio del suelo. Existen dos tipos procesos conocidos, el intercambio catiónico y el intercambio aniónico (De Dardel, 2015).

En la capacidad de intercambio catiónico (CIC), se presentan enlaces de intercambio entre los cationes más importantes dentro de la composición del suelo como lo son el calcio, magnesio, potasio, sodio, aluminio y amonio. Mientras, en la capacidad de intercambio aniónico (CIA), se da paso al intercambio con aniones presente en el suelo, aquí tenemos compuestos como fosfatos, sulfatos y cloruros (Ketterings, Reid, & Rao, 2007, pág. 1).

3.1.3 Propiedades biológicas

Las propiedades biológicas son las que se asocian a la presencia e interacción de la materia presente con los organismos vivos del suelo. Dentro de los parámetros considerados biológicos tenemos la materia orgánica y biodiversidad intrínseca.

3.1.3.1 Materia orgánica

La materia orgánica es producto de la descomposición química y biológica de residuos, sean estos vegetales, animales o excreciones. Está formada por compuestos tanto húmicos (p. ej. ácidos húmicos) como no húmicos (p. ej. proteínas, aminoácidos, azúcares y almidones) (Fenton, Albers, & Katterings, 2008, págs. 1-2).

Además, en suelos minerales la materia orgánica abarca un 20 % de su composición, mientras los suelos orgánicos tienen en más de 90 % contenido de materia orgánica. También es importante recalcar que la materia orgánica es un factor biológico esencial en la productividad del suelo (Fenton, Albers, & Katterings, 2008, págs. 1-2).

3.1.3.2 Biodiversidad

La biodiversidad también conocida como diversidad biológica, está definida como la variabilidad en diferentes escalas de organismos vivos ya sea en un ecosistema terrestre, acuático o aéreo. El término engloba la diversidad genética, diversidad de los organismos y diversidad ecológica, es decir, dentro de las especies (variación en genes), entre las especies, y entre los ecosistemas, hábitats y comunidades naturales, respectivamente. (FAO, 2015, pág. 1).

En este contexto hablaremos de la diversidad de especies, la misma que abarca dos componentes principales: riqueza de especies y la composición de especies. En donde es la variación en la composición de especies que proporciona la base mecanicista para explicar la relación entre la riqueza de especies y el funcionamiento de los ecosistemas. Las especies difieren unas de otras en su uso de los recursos, tolerancias ambientales, y las interacciones con otras especies, de tal manera que la composición de especies tiene una

gran influencia en el funcionamiento del ecosistema y la estabilidad (Cleland, 2011, pág. 2).

3.1.3.2.1 Biodiversidad del suelo

La heterogeneidad física, química y espacial de los suelos como hábitat, y las múltiples adaptaciones de los organismos a este complejo ambiente, es probablemente la principal causa de existencia de alta biodiversidad de organismos (Havlicek & Mitchell, 2014, págs. 28-29).

Los suelos contienen una gran variedad de organismos, muchos de ellos aún desconocidos y que cumplen funciones como las de crear agregados, donde la actividad y diversidad microbiana es intensa. En el suelo podemos encontrar una diversidad englobada en los tres dominios de la vida: Archaea, Bacteria y Eukarya (Wurst, De Deyn, & Orwin, 2012, pág. 28).

Según los autores Wurst, De Deyn y Orwin (2012, pág. 28) , hay cuatro grupos que conforman la biodiversidad del suelo de acuerdo a su tamaño. La microfauna agrupan organismos menores a 100 μm (p. ej. bacteria, archaea y fungi), la mesofauna abarca organismos de entre 100 μm y 2 mm (p. ej. nematodos, colémbolos, ácaros), la macrofauna incluye organismos de un tamaño mayor a 2 mm (p. ej. miriápodos e insectos), y la megafauna con un tamaño de más de 2 cm (p. ej. lombrices y ciempiés).

Por otro lado, dependiendo de la porosidad del suelo en cada tipo de textura, los microorganismos dependiendo de su tamaño habitarán dichos suelos. A continuación en la *Figura 6* adaptada de *Environmental Microbiology* se muestra lo mencionado ((Pepper, Gerba, Gentry, & Maier, 2009, pág. 62).

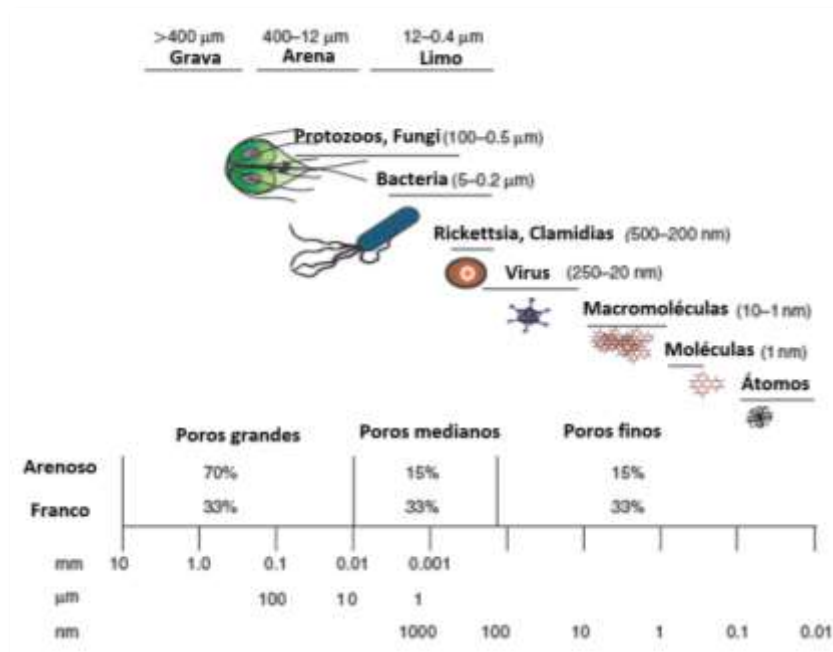


Figura 6. Microorganismos que habitan los suelos dependiendo de la porosidad de cada tipo de textura.

Adaptada de *Environmental Microbiology*, 2009, pág. 62.

3.1.4 Tipos de suelo

La composición general del suelo depende de 5 factores principalmente. El material parental, que hace referencia a las rocas sobre las cuales el suelo reposa. También, el tiempo y clima, lo que implica el ciclo de día o de noche y estación del año. Además de la topografía y organismos que habitan dicho suelo (Science Learning, 2007).

Las características de cada tipo de suelo dependen de los factores antes mencionados y conjuntamente de propiedades físico-químicas dadas por otros factores. Pero, es indispensable mencionar que todas estas características se ven influenciadas por factores externos como procesos de contaminación en este ecosistema. Una de las fuentes de contaminación del suelo con mayor perturbación a sus propiedades físicas, químicas y biológicas, es el derrame de sustancias tóxicas (p. ej. petróleo, pesticidas, etc.). El petróleo genera efectos

directos sobre la biota del suelo principalmente, pero además afecta su estructura (Zamora, Ramos, & Arias, 2012, pág. 5).

3.2 Petróleo

3.2.1 Generalidades

El petróleo también llamado petróleo crudo, es el vocablo que se deriva del latín *petra* y *oleum* que significa aceite de roca (Long & Speight, 1998). El término se emplea para describir a una amplia variedad de fluidos líquidos, gaseosos, semi sólidos y sólidos de origen natural ricos en hidrocarburos, que se ha acumulado en depósitos subterráneos (Speight, 2012, pág. 54).

Los hidrocarburos tiene varias estructuras moleculares (p.ej. cadenas lineales y ramificadas, anillos sencillos, condensados o aromáticos), y el petróleo es una mezcla compleja y variada de estos, por ello su composición depende de los compuestos orgánicos que lo conforman y la estructura de los mismos (Speight, 2012, pág. 55).

A esta variación se suma la composición química básica de elementos como carbono (84 - 87 %), hidrógeno (11 - 14 %), nitrógeno (0 - 1 %), oxígeno (0 - 4 %), azufre (0 - 8 %), níquel, vanadio, cromo, cadmio, bromo, mercurio, entre otros metales pesados (Howe-Grant, 1996, págs. 342-480).

3.2.2 Productos Derivados del Petróleo


Los productos del petróleo son químicos complejos provenientes del proceso de refinación. Su caracterización implica una profunda descripción de sus propiedades físico-químicas. Los tipos de hidrocarburos siguen siendo determinados con base en la capacidad para aislarlos mediante técnicas de separación. Los cuatro tipos fraccionarios en los que se subdivide petróleo son parafinas, olefinas, acetilenos y aromáticos. Estos términos se basan en la

combinación de hidrocarburos y la acción del solvente usado en el proceso de separación, que posee cada familia de derivados de petróleo (Speight, 2014a, págs. 720-722).

Las parafinas incluyen alcanos lineales y ramificados, las olefinas abarcan alquenos lineales y ramificados con dos o más dobles enlaces, los acetilenos hace referencia a los alquinos lineales o ramificados y los aromáticos contienen los hidrocarburos con uno o más anillos bencénicos (Speight, 2015, pág. 7). A continuación en la *Tabla 1* se puede apreciar lo mencionado anteriormente:

Tabla 1.

Clasificación de los Derivados del Petróleo de acuerdo al tipo fraccionario.

Tipo Fraccionario del petróleo	Grupo Funcional	Fórmula General
1. Parafinas (alcanos)	$-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 -$	$\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$
2. Olefinas (alquenos)	$-\text{CH} = \text{CH} -$	C_nH_{2n}
3. Acetilenos (alquinos)	$-\text{C} \equiv \text{C} -$	$\text{C}_n\text{H}_{2n-2}$
4. Hidrocarburos Aromáticos		1 o más anillos bencénicos

Dentro de los productos derivados del petróleo tenemos: gas, etano, gas licuado de petróleo, nafta, gasolina, combustible de aviación, combustible de uso marítimo, queroseno, combustible diésel, combustible líquido destilado, combustible residual, gasóleo, lubricantes, gasolina blanca, vaselina, cera, asfalto, coque y productos petroquímicos (Speight, 2014b, pág. 2).

3.2.1.1 Gasolina Blanca

El término Gasolina Blanca o también llamada Gasolina Mineral, hace referencia a los hidrocarburos incoloros o muy pálidos dentro de la clase de aceite lubricante en lo que se refiere al número de carbonos e intervalo de ebullición. La gasolina blanca es un término que indica hidrocarburos líquidos derivados de petróleo destilado con alto grado de refinamiento (no incluye cera ni petrolato) (Speight, 2015, págs. 19-20).

Actualmente, el término también se emplea para hablar de fracciones de petróleo, desde queroseno hasta aceite lubricante viscoso, los mismos que han sido empleados para tratar la remoción de constituyentes reactivos para dar productos derivados del petróleo incoloros, inodoros y no reactivos (Speight, 2015, pág. 207).

La gasolina blanca está fabricada a partir de crudos nafténicos o crudos parafínicos, la elección de cualquiera de ellos determinará la naturaleza predominante de las especies de hidrocarburos en el producto final. Después del proceso inicial de refinación, son sometidos a una refinación intensa con el fin de remover constituyentes que afecten el color, olor, sabor y propiedades toxicológicas. Es decir, remoción de compuestos aromáticos, sulfurados, oxigenados, nitrogenados, metálicos y olefinas (Speight, 2015, pág. 209).

Su composición final es en su mayoría de hidrocarburos saturados y de distintos grados de viscosidad, factores determinados en parte por el corte de destilación o rango inicial de ebullición empleado el comienzo del proceso de refinación (Speight, 2015, pág. 209).

En el Ecuador, la gasolina blanca es llamada JP, siglas que provienen de su connotación en inglés *Jet Fuel*, es decir, Gasolina de Avión. Pero, también tiene sinónimos como Queroseno, Queroseno de aviación, Jet A, Jet A-1, JAA, JP-8, F-34 y JP-1, con una variación ligera en el porcentaje de composición de

hidrocarburos es este último mencionado. A continuación en la *Tabla 2* se indica la composición del JP que se produce en el país y que cumple con los estándares establecidos por Chevron (Texaco) (U.S. Oil & Refining Co., 2013, pág. 1).

Tabla 2.

Composición de la Gasolina Blanca (Jet Fuel) establecida por Chevron (Texaco) en Ecuador.

Compuesto	Número CAS	Concentración
Queroseno	8008-20-6	90 – 100 %
Ciclohexano	110-82-7	0 – 1 %
1,2,4 Trimetilbenceno	95-63-6	0 – 2 %
Benceno	71-43-2	0 – 0.2 %
Tolueno	108-88-3	0 – 0.5 %
Xileno	1330-20-7	0 – 2 %
Naftaleno	91-20-3	0 – 3 %
Etilbenceno	100-41-4	0 – 0.5 %

Adaptada de *Material safety data sheet Jet Fuel*, 2013, pág.1

3.2.2 Industria Hidrocarburífera en el Ecuador

El descubrimiento del petróleo en nuestro país se da en el año 1924 en la península de Santa Elena por la empresa Angla Ecuadorian Oilfields Ltda. Este hallazgo da inicio, en el año 1925, a la actividad hidrocarburífera en la región occidental del Ecuador. La empresa sale del mercado por deudas y entra a la industria en 1948, la empresa Royal Dutch Shell (Martz, 1897, pág. 28). Este inicio fue muy modesto hasta que casi 40 años después, para 1967, la empresa Leonard Exploration Co. descubre yacimientos en la Amazonía que desatan una actividad petrolera de alto impacto (Kimerling, 1993, pág. 23).

Luego, el interés sobre el crudo ecuatoriano se expande, en donde ya se abarcan lugares como Lago Agrio, Sacha y Shushufindi por parte de la empresa Texaco-Gulf. En donde la Texaco expande actividades y operaciones que provocan descubrimientos petroleros, los mismos que amplía una cadena de concesiones de interés internacional en el petróleo ecuatoriano. Así, en 1968 se dan contratos con 7 empresas, entre las cuales CHEVRON consta como una de las firmas extranjeras (Texaco, 2010). Entonces fue en 1972 donde se inicia la verdadera explotación, producción y comercialización del crudo ecuatoriano (Martz, 1897, pág. 40).

Además, aquí es donde la grande expectativa que se tenía en el petróleo genera el desarrollo de una de las operaciones infraestructurales petroleras de mayor inversión e impacto, el Sistema de Oleoducto TransEcuatoriano (SOTE). El mismo que en su recorrido de más de 500 Km, cuenta con seis estaciones de bombeo: Quinindé, Papallacta, Baeza, El Salado, Lumbaqui y Lago Agrio (EP PETROECUADOR, 2016).

A raíz del creciente dominio de petróleo ecuatoriano por parte de empresas extranjeras se dan concesiones, las mismas que terminan dando paso a la creación de la Corporación Estatal Petrolera Ecuatoriana (CEPE). La corporación se inicia en 1972 con la aleación al consorcio Texaco-Gulf, lo que le otorga un 25 % de las acciones (Acosta, 1986, pág. 8). Luego, un año después a través de una mediación de CEPE, el Ecuador ingresa a la Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP). Este logro tuvo fin 21 años después, ya que en 1993 durante el gobierno de Sixto Durán Ballén, se retiró al país de la organización (Arosemena, 1995, pág. 23).

Luego, Gulf se retiró del consorcio Texaco-Gulf-CEPE, cediéndole 37 % más de acciones a CEPE. Posteriormente, Texaco cede del consorcio y CEPE pasa a ser accionista total de la producción petrolera (Acosta, 1986, pág. 9). Así, en 1989 CEPE pasa a convertirse en PETROECUADOR, empresa estatal formada junto con la afiliación de empresas como Petrocomercial, Petroamazonas,

Petroindustrial, Petroproducción, Petrorransporte y Petropenínsula (Guerra, 1998, pág. 11).

Después, en 1993, Petroproducción descubre nuevos yacimientos de explotación petrolera en la que ingresan a la industria hidrocarburífera los campos de Ishpingo, Tiputini y Tambococha (ITT). Pero, en 1998 durante el gobierno de Jamil Mahuad, el Parque Nacional Yasuní y Parque Nacional Cuyabeno quedan exentos de actividad petrolera, en donde los campos ITT entran dentro de los cuadrantes de protección. Esta moción fue reforzada en el año 2007 con la Iniciativa Yasuní- ITT, proyecto del gobierno de Rafael Correa (Larrea, 2012, pág. 2).

En la Iniciativa Yasuní-ITT se condicionó la protección a los Parques Nacionales, siempre y cuando exista una compensación para el país por parte de la comunidad internacional. Esta compensación hacía referencia a la remuneración que debía recibir el Ecuador por no explotar los recursos petroleros, por ende no percibir ingresos económicos de sustento a la economía del país, y también por contribuir a la permanencia del mercado de carbono bajo tierra. Pero, la iniciativa tuvo fin en el año 2013, pues se inició la explotación petrolera en el 0,1 % de la zona (Larrea, 2012, págs. 40-41).

De esta manera, durante más de 70 años de explotación petrolera en el Ecuador, el petróleo ha sido un recurso que ha generado gran cantidad de recursos para el país, tanto para el recurso económico, comercial y social. Sin embargo, en los últimos 40 años los beneficios de la industria petrolera fueron mayormente absorbidos por las empresas internacionales instaladas en nuestros campos. Mientras, el país apenas percibía parte marginal de los recursos petroleros y derivados del mismo (Fontaine, 2004, págs. 11-12).

Por esto, en el 2010 la empresa Wood McKenzie presta servicios de consultoría al Ecuador en donde indica que las provisiones de crudo de petróleo solo duraran en el país hasta el año 2045 (Wood Mackenzie, 2014,

pág. 14). El actual EP PETROECUADOR no comparte lo dicho, pues la empresa anuncia que las reservas ecuatorianas duraran hasta el año 2065 o 2070. El futuro de la industria hidrocarburífera en el Ecuador depende de las decisiones que se tome sobre los campos protegidos de explotación, de los cuales PETROECUADOR posee el 91 % y empresas privadas el 9 % de territorio (PetroAmazonas, 2014, págs. 12-13).

3.2.3 Legislación Hidrocarburífera y Ámbito Ambiental

3.2.3.1 Ley de Hidrocarburos

La ley de Hidrocarburos, que norma y regula el sector hidrocarburífera, es uno de los hitos de la industria petrolera en el Ecuador, que tuvo lugar en el año 1971 durante el gobierno de Velasco Ibarra. A través de esta ley se decide la nacionalización de la industria petrolera, lo que implica el control de actividades de exploración, explotación, refinación, transporte, distribución, comercialización y prospección en nuestro país, sentando su apoyo en la CEPE (Gobierno, 1978). Desde su creación ha sufrido varias modificaciones, la última y que rige hasta la actualidad es la del 24 de Noviembre de 2011 (Ministerio de Hidrocarburos, 2016) .

3.2.3.2 Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas

Este reglamento también conocido como el Decreto Ejecutivo 1215, se creó en el año 2001 durante el gobierno de Gustavo Noboa Bejarano. Este Decreto anteriormente conocido como el Reglamento Ambiental de Operaciones Hidrocarburífera del Ecuador (RAHOE), se crea con el fin de expedir un nuevo reglamento sistemático de disposiciones que normen la gestión ambiental en las actividades Hidrocarburíferas. Entonces, dando paso al control y regulación de aspectos socio-ambientales que se exponen durante la actividad petrolera (Noboa Bejarano, 2001).

Dentro del Decreto 1215, en los Parámetros, valores máximos referenciales y límites permisibles para el monitoreo ambiental rutinario y control ambiental (Anexo 2 del Decreto 1215), se tienen los Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicios (Noboa Bejarano, 2001), la misma que se presenta a continuación en la *Tabla 3* para fines del proyecto planteado.

Tabla 3.

Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicios.

Parámetro	Expresado en	Unidad	Uso Agrícola	Uso Industrial	Hábitats Sensibles
Hidrocarburos totales	TPH	mg/kg	< 2500	< 4000	< 1000
Hidrocarburos aromáticos Policíclicos	C	mg/kg	< 2	< 5	< 1
Cadmio	Cd	mg/kg	< 2	< 10	< 1
Níquel	Ni	mg/kg	< 50	<100	< 40
Plomo	Pb	mg/kg	< 100	< 500	< 80

Tomada de Decreto 1215, 2001, pág. 57

3.3 Impacto Ambiental

El petróleo crudo al igual que otros combustibles fósiles es una fuente de energía basada en el carbono, que, como el proveedor de energía primaria global, tiene implicaciones ambientales que son de largo alcance, transfronterizo y podría ser grave dependiendo del nivel de insostenibilidad en

su explotación. El proceso de refinación del petróleo llevado a cabo por el hombre, ha llevado a construir una considerable contaminación atmosférica de efecto invernadero, siendo este fenómeno el de mayor contribución para el calentamiento global y cambio climático (Atsegbua & Aigbokhaevbo, 2014, págs. 90-92).

La extracción del petróleo está relacionada principalmente con los riesgos ambientales y de salud, en donde los reactivos empleados durante el proceso tienen un efecto peligroso sobre el ambiente. La eliminación inadecuada de fluidos residuales y químicos usados en el proceso de refinación, contaminan las aguas y suelos de manera subterránea y superficial. Los derrames petroleros, explosiones de pozos, corrosión de tuberías, mal estado de equipos, son las principales causas de impacto ambiental. En donde, los gases tóxicos y partículas volátiles que se emanan y liberan al aire, son perjudiciales para el ser humano y demás seres vivos (Atsegbua & Aigbokhaevbo, 2014, pág. 93).

Los efectos que más sobresalen en cuanto al impacto de los hidrocarburos en el ambiente, y que son de mayor preocupación son: la acumulación y magnificación en cadenas tróficas, y la pérdida de nichos ecológicos.

a. Acumulación y magnificación en cadenas tróficas

Una cadena trófica es el proceso en eslabones que describe la transferencia de energía entre organismos, empezando por los productores (p. ej. organismos autótrofos) seguido de los consumidores (p. ej. organismos autótrofos) y finalmente los descomponedores. Cuando ocurre la contaminación de un hábitat sea acuático o terrestre lo que sucede es que se afecta a los organismos que dependen del eslabón perturbado (Bravo, 2007, pág. 32 y 55).

La acumulación de contaminantes que se da en los procesos de perforación del petróleo crudo afecta a la cadena trófica marina y terrestre. Además, cuando

una cadena trófica terrestre se ve afectada (p.ej. plantas) se afecta también a la cadena trófica de los polinizadores que depende de las plantas o aves, reptiles y anfibios que dependen de ciertos polinizadores, e incluyendo al ser humano. A este fenómeno se lo denomina biomagnificación y en la *Figura 7* se muestra lo mencionado (Brennan, 2010).

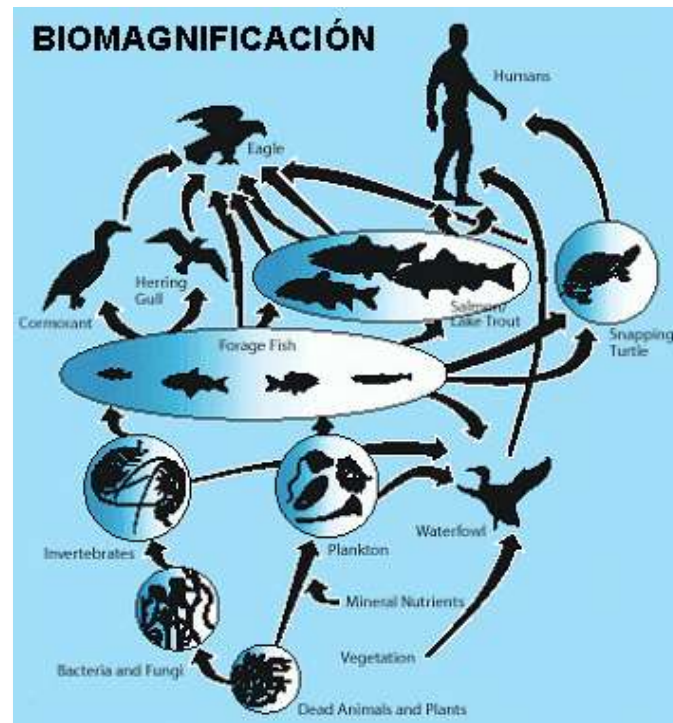


Figura 7. Bioquímica Ambiental: Biomagnificación.

Recuperado de Tejedor (2013).

Por otro lado, los seres humanos que se encuentran integrando el eslabón de consumidores de la cadena trófica también son afectados por la contaminación y en mayor proporción, a lo que se llama bioaumentación. En donde, el término hace referencia a la acumulación de sustancias tóxicas (p. ej. metales tóxicos, productos derivados del petróleo, plaguicidas, etc.) en organismos de la cadena trófica, cuya concentración aumenta de los tejidos de los organismos a medida que asciende en los eslabones de dicha cadena (Zambrano, y otros, 2012, págs. 1-2). La *Figura 8* muestra un ejemplo de la bioacumulación del compuesto DDT.

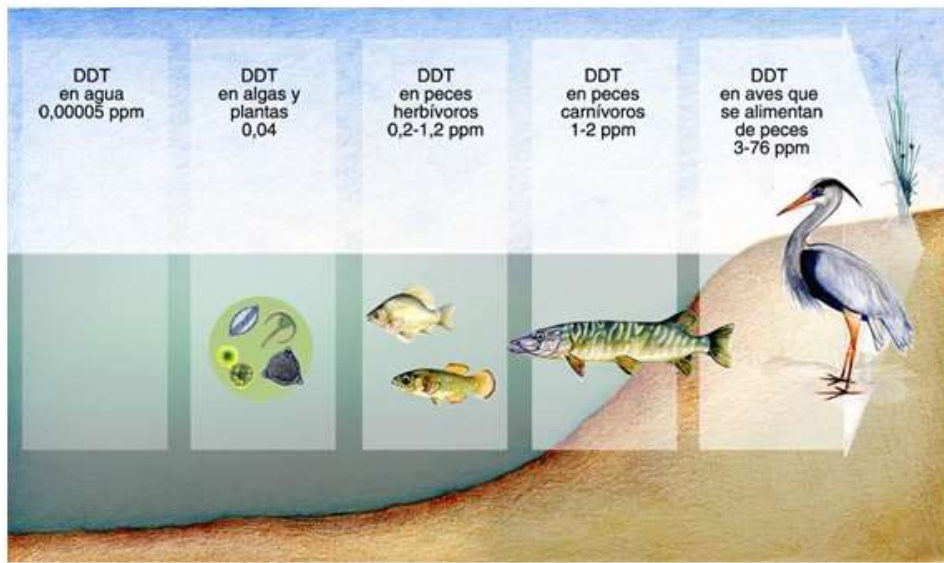


Figura 8. Bioacumulación de tóxicos.

Recuperado de Ecoticias (2016).

b. Pérdida de nichos ecológicos

Un nicho ecológico hace referencia a la posición que ocupa una población en un ecosistema determinado, en donde influyen factores bióticos y abióticos, además de los antrópicos. En un nicho conviven varias especies, y a veces tienen dependencia entre ellos. Por ello, la pérdida, la degradación y fragmentación de hábitats ecológicos a causa de la contaminación petrolera genera un declive invaluable al equilibrio de los ecosistemas terrestres y acuáticos (Tellería, 2013, pág. 21 y 22) .

La pérdida de nichos ecológicos se da por varios causales, incluyendo a los vinculados con la industria hidrocarburífera, como la deforestación, explotación excesiva de recursos, contaminación de agua y suelos, emisión de gases, etc. (Tellería, 2013, pág. 18 y 19) .

Entre las consecuencias tenemos que especies más resistentes o adaptadas a los distintos hidrocarburos pasan a ocupar los nichos ecológicos de las especies que mueren o desaparecen, lo que afecta la biodiversidad y dificulta

la recuperación del ecosistema (Tellería, 2013, pág. 19 y 20). En donde, el Ecuador, considerado un país megadiverso corre un alto riesgo de pérdida de nichos ecológicos lo que implica pérdida de especies endémicas e inclusive especies únicas (Acción Ecológica, 2013).

Adicionalmente, se debe mencionar que industria hidrocarburífera afecta tanto a sistemas físicos y biológicos, en donde, los productos derivados del petróleo y el uso de los mismos, generan impacto en suelo, aire y agua.

3.3.1 Impacto en el Suelo

Una importante causa de la pérdida de biodiversidad del suelo es la contaminación generada por derivados del petróleo. Entre alguno de ellos tenemos el aceite residual de los procesos de refinación, o derrames de lubricantes, aceites, aditivos, entre otros. Estos derivados contienen sustancias tóxicas y dañinas como benceno, cadmio, zinc, arsénico, plomo. Sin dejar de lado los hidrocarburos aromáticos policíclos (HAP's) y los policlorobifenilos (PCB's), los compuestos más perjudiciales y dañinos para el suelo, además de ser considerados mutagénicos y cancerígenos (Madanhire & Mbohwa, 2016, págs. 17-19).

La producción de lubricantes, aditivos y productos en general es cada vez más requerida, pues el mercado de maquinaria pesada, el mercado automotriz, mercado químico aumentan, con lo que se requieren de compuestos derivados de óleo mineral. Así, cuando los lubricantes son drenados de motores, sistemas hidráulicos, turbinas, compresores de aire, etc., y son liberados en el suelo. Estos generan otros compuestos como desengrasantes, solventes, etc. que se mezclan con el suelo y provocan cambios en las propiedades del suelo como: percolación de sustancias químicas, cambio de pH, aumento de la humedad y densidad, menos productividad biológica y contenido de fósforo y potasio, y disminución de la capacidad de campo, porosidad, permeabilidad, volatilización de compuestos, etc. (Madanhire & Mbohwa, 2016, págs. 19-21)

Dentro de los fenómenos que ocurren en el suelo a causa de contaminación por petróleo, está la presencia de hidrocarburos intemperizados, hidrocarburos recalcitrantes y presencia de metales pesados.

- a. Hidrocarburos intemperizados._** Los hidrocarburos de petróleo intemperizados o conocidos como hidrocarburos erosionados son altamente complejos que han adquirido una composición sólida y compacta, que llega hasta la formación de rocas por la litificación, por lo que son considerados contaminantes importantes del suelo. A pesar de su estudio, todavía no están suficientemente comprendidos o caracterizados adecuadamente para informar el riesgo que generan en el suelo. La comprensión de la biotransformación de estos contaminantes y su toxicidad residual son esenciales para mejorar estrategias de biorremediación y la regeneración efectiva de suelos (UNAM, 2008, pág. 1).
- b. Hidrocarburos recalcitrantes._** Los hidrocarburos de carácter recalcitrante son aquellos que son resistentes a la degradación, por lo que persisten casi intactos en el suelo. El carácter recalcitrante se da debido a su composición, pues muchas veces presentan sustituciones (p. ej. cloro), enlaces poco comunes o complejos, anillos aromáticos condensados, extensa cadena de carbonos, incompatibilidad con los agentes microbianos de degradación, toxicidad del compuesto en sí o de sus derivados y baja disponibilidad. Sus efectos generan bioacumulación y bioaumentación en la cadena trófica (Rodríguez, y otros, 2005, pág. 366).
- c. Metales tóxicos._** Los metales tóxicos en el suelo se generan cuando se da la extracción del petróleo, pues la excavación y aumento de la cantidad de microelementos en el suelo los convierte en macroelementos que afectan la biodiversidad y calidad del suelo. Por lo general, se asocian con otras moléculas lo que genera moléculas más

complejas o más tóxicas (Ortiz, Sanz, Dorado, & Villar, 2010, pág. 13 y 35).

d. Metales pesados._ Las propiedades del suelo tienen un papel importante en la estancia de los metales pesados (p. ej. arsénico, cadmio, cobalto, mercurio, níquel, zinc, plomo, etc.), su biodisponibilidad depende de las características del suelo y también de sus características intrínsecas como metal pesado. Los metales pesados suelen acumularse en la superficie y son eliminados por procesos como la lixiviación, volatilización la erosión, la deflación y consumo por plantas (Puga, Sosa, Lebgue, Quintana, & Campos, 2016, págs. 149-150) .

3.3.2 Impacto en el Agua

Al referirse a una contaminación de agua se debe tomar en cuenta que se hace referencia a una contaminación en agua dulce (p. ej. ríos, lagunas, lagos y vertientes) y en agua saladas (mares y océanos). La contaminación por hidrocarburos derivados del petróleo en el agua genera un cambio y desequilibrio en las propiedades organolépticas del agua, esto implica un riesgo para la naturaleza y el ser humano (Prieto & Martinez, 2013, pág. 2) .

La contaminación en ecosistemas de agua dulce, por lo general se da por descarga de aguas residuales de la industria hidrocarburífera o por derrames petroleros ocasionados en estas áreas. De esta manera, los mares se contaminan por ser la desembocadura de ríos o vertientes. Por otro lado, el mayor porcentaje de contaminación de ecosistemas, como mares y océanos, se origina por el transporte de hidrocarburos. Los accidentes de transporte (p. ej. explosiones, naufragios, derrames en carga y descarga, etc.) dañan el ecosistema marino y de las costas, lo que afecta a recursos usados por el hombre (p. ej. actividad pesquera) e incluso a la biodiversidad marina (Casas, 2014, págs. 1-4).

Entre los efectos que se producen en las aguas afectadas por derrames de petróleo cabe mencionar la disolución, la dispersión, la emulsificación, fotooxidación, entre otras.

- a. **Disolución.**_ La disolución hace referencia a la forma en la que el petróleo se disuelve en el agua. En este, las fracciones del hidrocarburo con menor peso molecular se diluyen en la columna de agua. La velocidad y tasa de disolución depende de varios factores, entre ellos, el tipo de hidrocarburo, características del agua, dispersión, movimiento del agua, etc. (Silos, 2008, pág. 57).
- b. **Dispersión.**_ Este proceso tiene efecto sobre la disolución de un hidrocarburo en el agua. Lo que sucede es que una proporción del hidrocarburo tiende a dispersarse en la columna de agua, y las gotas de carácter oleoso se dispersan por la superficie y son transportadas por las corrientes. Existen dos tipos de dispersión la vertical y la redispersión (Cetmar, 2012).
- c. **Emulsificación.**_ Se denomina así al proceso en el que el agua se incorpora al hidrocarburo, lo que cambia las propiedades físico-químicas del mismo. Los factores intrínsecos (p.ej. viscosidad) y factores extrínsecos al hidrocarburo (p.ej. viento) son los que intervienen en la formación de emulsiones. La emulsificación puede duplicar el volumen del contaminante derramado, y por lo general se forman emulsiones gelatinosas y aceitosas. Este tipo de emulsiones generan bolas de alquitrán que tienen un carácter y apariencia asfáltica (Philips, 2015).

3.3.3 Impacto en el Aire

Durante el proceso de refinación del petróleo se da la tasa de emisión de gases más alta, en donde se libera: material particulado y gases tóxicos. En donde, los gases tóxicos, dentro de los cuales se consideran gases de efecto invernadero, tenemos óxidos de azufre y nitrógeno, aldehídos, monóxido y

dióxido de carbono, compuestos volátiles de derivados del petróleo e hidrocarburos totales del petróleo. El impacto en el aire a causa de la industria petrolera se da por procesos como evaporación, volatilización y oxidación de compuestos petroleros, entre otros (Bravo, 2007, pág. 28).

- a. **Evaporación.**_ En este proceso los derivados del petróleo pasan de un estado líquido a un estado gaseoso. En la industria hidrocarburífera la evaporación se da en procesos de almacenamiento y transporte en su mayoría. Los vapores y gases liberados se pierden por procesos de venteo, por emisión de tanques y válvulas de almacenamiento, y procesos de despacho (ITOPF, 2012, pág. 4).
- b. **Volatilización.**_ Los compuestos derivados del petróleo presentes en suelo o agua terminan volatilizándose hacia la atmósfera, dependiendo de sus características físico-químicas. No es un mecanismo que tenga normalmente efecto nocivo, pero al tratarse de contaminantes derivados del petróleo el efecto es significativo. En donde, los compuestos aromáticos de alto peso y alta toxicidad (p. ej. Benceno, Tolueno y Xileno) tienden a permanecer en suelo y agua, pero los policíclicos se encuentran en forma de vapor o partículas componiendo el aire. Mientras, los compuestos alcanos (p.ej. hexano y octano) tienden a volatilizarse con facilidad (Silos, 2008).
- c. **Oxidación.**_ La oxidación de un compuesto derivado del petróleo genera dióxido de carbono y otros compuestos como fenoles y acetonas. Este tipo de emisión es difícil de controlar pues se da básicamente entre radicales libres de los hidrocarburos y a veces sucede por reacciones fotoquímicas que se dan en la atmósfera. La fotooxidación es cuando se forman compuestos solubles o alquitranes a partir de un hidrocarburo oxidado a causa de la estimulación de la luz solar (ITOPF, 2012, pág. 6).

3.4 Impacto Económico y Social

El petróleo crudo, que es uno de los variantes de combustibles fósiles, es la fuente de energía más importante y el producto más comercializado en el mercado global. La primacía del petróleo y sus derivados como fuente de energía ha proporcionado una plataforma para el desarrollo socio-económico en la mayoría de los países productores y consumidores de petróleo (Atsegbua & Aigbokhaevbo, 2014, pág. 89).

Esto debido a su uso para cocinar, calentar la casa, combustible para aeronaves, automóviles y máquinas, asfaltar carreteras, aumentar la fertilidad del suelo (p. ej. insecticidas y fertilizantes), cosméticos y productos comerciales (p. ej. plásticos). Esto da cuenta de la versatilidad del petróleo crudo, lo que determina la tendencia inflacionaria en los alimentos, el transporte, la inversión y los servicios (Atsegbua & Aigbokhaevbo, 2014, pág. 90).

El crudo de petróleo se ha transformado en un instrumento financiero utilizado por los países para protegerse contra las tendencias de inflación del precio del petróleo o para transferir el riesgo a especuladores. Pero, la constante agitación en el proceso de explotación del petróleo en donde existe constante perturbación de los ecosistemas y la población (Atsegbua & Aigbokhaevbo, 2014, págs. 92-93).

Además, la desapropiación étnica, instalación de equipos de bombeo y tuberías, abastecimiento de combustible de petróleo, sabotaje, etc. a menudo son factores adoptados por las comunidades residentes como invasión social y fenómeno de contaminación (p. ej. ríos de pesca, tierras de cultivo, etc.), lo que acarrea un problema socio-económico muy alto. En donde, el proceso de producción y la consecuente presión ambiental generada, ha originado continuos conflictos entre comunidades de acogida y empresas multinacionales petroleras (Atsegbua & Aigbokhaevbo, 2014, págs. 94-96) .

3.5 Impacto en el Ecuador

La industria petrolera en el Ecuador inicia desde hace casi 40 años y cuya actividad se ha encargado de exaltar las consecuencias negativas que acarrea tanto sociales, culturales, de salud y la más importante de carácter ambiental.

En cuanto al ámbito social y cultural se hace referencia a los pueblos indígenas que se encuentran habitando territorios aledaños a las áreas de actividad petrolera, como son las ciudades de Lago Agrio, Sushufindi y Coca, por ejemplo. Los territorios mencionados están centralizados en la exploración, explotación, refinación y transporte del crudo por lo que contienen instalaciones como oleoductos, estaciones de tratamiento y bombeo, carreteras, helipuertos, entre otros elementos que perturban la salud del ser humano y el estado de la naturaleza (Cuvi & Bejarano, 2015, pág. 10).

En la historia del Ecuador, el caso que encabeza en cuanto a contaminación ambiental por hidrocarburos, es la provocada por la multinacional Chevron. La empresa enfrentó una denuncia judicial del Estado al establecerse que había provocado afectaciones en suelo, agua, biodiversidad y salud de personas en el lado norte de la Amazonía desde que inició su actividad en 1967 cuando se la conocía como la empresa Texaco. La contaminación en casi medio millón de hectáreas que dejó, se daba por el derrame de crudo al perforar los pozos, por rupturas de los ductos de transporte y por desfuegos de aguas compuestas por metales pesados (Cuvi & Bejarano, 2015, pág. 11).

La reseña histórica de los derrames en el Ecuador es una lista interminable lleno de hallazgos. El primer derrame registrado en 1972, cuatro días luego de inaugurado el SOTE, en donde se derramaron cerca de treinta y dos mil barriles en la provincia de Esmeraldas (Bennett, 1972). Para 1973, es decir el segundo año de extracción de crudo, ya se estimaron 17 fugas petroleras que afectaron a la provincia de Orellana específicamente en Joya de los Sachas (Ministerio del Ambiente, 1973)

Luego, un año después Baeza en la provincia de Napo es víctima de tres rupturas del SOTE. Este hallazgo fue el primero en reportarse la afectación en dos ríos de la Amazonía, el río Coca y el río Aguarico. Pero, fue el año 1976 el que rompió las barreras y se lo considero el año de mayor número de derrames con casi 25 fugas a causa del deterioro de los ductos de transporte (Aumala, 2014) .

Y de esta manera, se establece datos oficiales desde el año 2001 en adelante, donde se reporta la ruptura del SOTE más de 40 veces en ese año. Luego, en el 2010 ya eran más de veinte cantones afectados por más de 38 derrames en Joya de los Sachas y más de 219 derrames en Lago Agrio. Para el año 2009 y 2013 se reportan dos grandes fugas de petróleo provocadas por daños en el Oleoducto de Crudos Pesados (OCP) (Aumala, 2014).

Lo que era un suceso preocupante se transformó en alarmante cuando en el año 2009, Acción Ecológica reportan los testimonios de habitantes de Pacayacu en Lago Agrio. Es estos daban a conocer las consecuencias de aguas contaminadas por actividad petrolera, lo que produjo fallecimiento de un número desconocido de habitantes (Acción Ecológica, 2016).

Finalmente, entre los años 2014 y 2016 Acción Ecológica reportó alrededor de no más de 20 derrames en áreas de actividad petrolera de Petroamazonas (Aumala, 2014).

3.6 Remediación Ambiental

La remediación ambiental es la terminología que define al empleo de cualquier tecnología de remediación en forma unitaria o conjunta, sean estas físicas, químicas o biológicas. Esto con la finalidad de remover o alterar la composición de cualquier compuesto contaminante que se encuentre en un ecosistema, e inclusive, reducir su toxicidad, su movilidad o su cantidad (Bhandari, y otros, 2007, págs. 1-3).

Para emplear cualquiera de los procesos, se debe tomar en cuenta ciertos factores primordiales, características y propiedades del suelo, propiedades fisicoquímicas y disponibilidad del contaminante, factibilidad de llevar a cabo el proceso y que la relación costo-beneficio sea favorable (Bhandari, y otros, 2007, pág. 4).

3.6.1 Clasificación de las técnicas de remediación

3.6.1.1 Estrategias de Remediación

La estrategia implica la manera en la que se va a tratar al contaminante, para ello encontramos tres estrategias: remoción o descomposición, extracción o separación y aislamiento o inmovilización (Ortiz, Sanz, Dorado, & Villar, 2007).

3.6.1.2 Lugar de la Remediación

La remediación de contaminantes se puede dar de dos formas, *ex situ* o *in situ*.

El proceso *In situ*, implica que el contaminante es tratado en el mismo sitio del área de contaminación, es decir, sin necesidad de ser extraído. La técnica no incluye procedimiento de excavación o transporte por lo que disminuye costos, pero generalmente toma más tiempo la remediación, es difícil determinar la eficacia del proceso, y la heterogeneidad del área puede ser una limitación (p. ej. en los suelos) (EPA, 2006, págs. 4-5).

Mientras, en el proceso *Ex situ* requiere de excavaciones o dragados que permitan remover el contaminante de esa área. El uso de esta técnica implica menor tiempo de tratamiento, pero se dan mayores costos por la maquinaria y tecnología, y la heterogeneidad es un factor controlable. Pero, es importante considerar la exposición y riesgo que implica el contacto con el contaminante al ser manipulado para su extracción y transporte (EPA, 2006, pág. 12).

3.6.1.3 Tipo de Tratamiento

Para facilitar el entendimiento del tipo de tratamiento que se puede emplear, se ilustra a continuación en la *Tabla 4*, las técnicas de tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos atendiendo al tipo de tratamiento: físico-químico, térmico o biológico.

Tabla 4.

Técnicas de tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos.

Técnica de tratamiento	Lugar de aplicación	Contaminante a tratar
Procesos Físico - Químicos		
Extracción de vapores	In situ	Compuestos orgánicos volátiles, algunos derivados del petróleo
Inyección de aire	In situ	Compuestos orgánicos volátiles
Aireación	Ex situ	Compuestos orgánicos volátiles
Bombeo de agua	In situ	Compuestos solubles
Enjuague de suelos	In situ	Fenoles, metales, aceites, contaminantes solubles, compuestos orgánicos
Lavado de suelos	Ex situ	Metales, derivados del petróleo, compuestos orgánicos volátiles
Tratamiento electrocinético	In situ	Metales, compuestos orgánicos
Tratamientos químicos	In situ	Bifenilos policlorados, contaminantes orgánicos
Barreras reactivas	In situ	Metales, hidrocarburos derivados del petróleo, compuestos orgánicos
Procesos Biológicos		
Bioestimulación	In situ	Hidrocarburos, derivados del petróleo, disolventes, sustancias químicas orgánicas.
Bioventing	In situ	Hidrocarburos derivados del petróleo, disolventes no clorados, compuestos orgánicos
Bioslurping	In situ	Hidrocarburos derivados del

		petróleo
Landfarmig	Ex situ	Lodos de refinería
Biopilas	Ex situ	Compuestos orgánicos volátiles, hidrocarburos
Compostaje	Ex situ	Explosivos, HAP's, compuestos orgánicos biodegradables
Biodegradación off site	Ex situ	Residuos de artillería, compuestos orgánicos volátiles, bifenilos policlorados
Fitorremediación	In situ	Metales, pesticidas, disolventes, explosivos, hidrocarburos del petróleo, HAP's
Procesos Térmicos		
Incineración	Ex situ	Todo tipo de compuestos orgánicos
Desorción térmica	Ex situ	Compuestos orgánicos de residuos de refinería, residuos de alquitrán, hidrocarburos

Adaptada de *Milarium Técnicas de Remediación de Suelos Contaminados*, 2008.

3.6.1.3.1 Procesos Físico Químicos

Estos tratamientos se basan en el aprovechamiento total o parcial de las propiedades físicas y químicas de los compuestos contaminantes o del área contaminada. Por lo general, son procesos aplicados al inicio de un proceso de remediación más no como solución final de descontaminación. Además, se los puede aplicar de forma *ex situ* e *in situ*, siendo de preferencia la última. Por otro lado, entre sus principales ventajas están la efectividad en costo y duración de corto plazo. Por ello, entre los tratamientos de carácter físico químicos tenemos, lavado de suelos, extracción con solventes, remediación electrocinética, solidificación-estabilización y extracción de vapores (Barbosa, 2011, págs. 172-173).

3.6.1.3.2 Procesos Térmicos

Los tratamientos térmicos hacen referencia al uso de altas temperaturas que permitan la destrucción de los contaminantes. Este tipo de procesos tiene como ventaja la rapidez con la que se da la descontaminación, pero también genera la liberación de vapores, cenizas y residuos líquidos. De esta manera, el proceso se ve involucrado en un alto impacto ambiental por la emanación de compuestos volátiles, y en un aumento de costo por la necesidad de tratar los residuos obtenidos. Dentro de estos procesos en carácter *ex situ* tenemos la incineración, la desorción térmica y la pirolisis, mientras los de carácter *in situ* son la vitrificación e inyección de aire o vapor caliente (Barbosa, 2011, págs. 173-174, 176) .

3.6.1.3.3 Procesos Biológicos o Biorremediación

La biorremediación surge de un proceso de degradación aerobia o anaerobia llevado a cabo por organismos vivos, lo que hace referencia a una mineralización completa de contaminantes orgánicos en dióxido de carbono, agua, compuestos inorgánicos, compuestos menos tóxicos y biomasa celular. La biodegradación es un proceso natural, que, con tiempo suficiente, los microorganismos inmersos pueden eliminar componentes derivados del petróleo o el petróleo crudo en sí de ambientes contaminados. De hecho, al verse abrumados por la cantidad del material derramado o el material tóxico, muchos de los microorganismos nativos de suelo o agua son capaces de degradar varios tipos de contaminantes de hidrocarburos (Dadrasnia, Salmah, Emenike, & Shahsavari, 2014, págs. 1030-1031).

Los microorganismos tienen una prospección promisoría con respecto a los hidrocarburos, pues se ha caracterizado como una técnica de remediación efectiva y económicamente beneficiosa. Sin embargo, como en otros sistemas y tecnologías de remediación, la biorremediación también presenta

limitaciones, y existen ciertas desventajas que se deben mencionar. (Speigh & Arjoon, 2012, pág. 8).

Entre las ventajas tenemos: su aplicación implica el uso de equipos ampliamente disponibles, fáciles de instalar y manejar, crea mínima interrupción y disturbio en actividades de alrededor, es decir, tecnología no invasiva, permite la combinación con otras técnicas de remediación para aumentar la remediación y tasa de degradación, mínima o nula producción de compuestos residuales que requieran remoción, es un proceso natural que por lo general presenta aceptación pública, entre otras (Speigh & Arjoon, 2012, pág. 9).

Mientras, entre sus desventajas se mencionan: pozos de inyección y galerías de infiltración pueden obstruirse por el crecimiento microbiano o la precipitación mineral del proceso, altas concentraciones de constituyentes de baja solubilidad pueden ser tóxicos o no biodisponibles, en ocasiones podría requerir monitoreo y mantenimiento continuo, generación de biodegradación incompleta lo que disminuye la eficiencia de remediación de la técnica, difícil de predecir el tiempo requerido para una mineralización completa, entre otras (Speigh & Arjoon, 2012, pág. 9).

3.6.2 Factores que inciden en la Biorremediación

La biorremediación es una técnica de remediación para la cual se deben tomar en cuenta tanto parámetros previos como durante el desarrollo del proceso.

3.6.2.1 Parámetros previos a la biorremediación

Un proceso de remediación es exitoso cuando se toman en cuenta los factores que limitan una estrategia de remediación. Entonces, es indispensable considerar ciertos aspectos para la selección de un proceso de remediación

ambiental. Por ello, se debe conocer las características y propiedades físicas, químicas y biológicas. (Volke & Velasco, 2002, págs. 11-12) .

a. Caracterización del contaminante

Para el proceso de biorremediación se debe conocer las propiedades y características del contaminante presente en el área de remediación. Pues cada hidrocarburo es asimilado, tolerado y metabolizado por los microorganismos de distinta manera. Por ello, es necesario conocer los siguientes elementos inherentes al contaminante: tipo de contaminante (orgánico o inorgánico), estructura, polaridad, volatilidad, solubilidad, carácter reactivo, concentración, toxicidad, distribución, difusión, adsorción, densidad, biodisponibilidad, biodegradabilidad, entre otras (Volke & Velasco, 2002, págs. 13-16).

b. Caracterización del suelo contaminado

Las áreas contaminadas, sean estas aguas o suelos, poseen distintas particularidades. Al tratarse de la remediación de un suelo, es necesario caracterizar el mismo meticulosamente, pues cada factor intrínseco afectará la tasa de remediación. De esta manera, se recomienda se debe identificar los siguientes factores: estructura, textura, heterogeneidad, densidad, porosidad, permeabilidad, aireación, humedad, pH, contenido de materia orgánica, entre otros (Volke & Velasco, 2002, págs. 16-18).

c. Caracterización biológica

La caracterización biológica es de suma importancia al tratarse de un proceso de biorremediación, pues de los factores biológicos dependerá la estrategia de remediación a emplear. Existen elementos biológicos esenciales que se deben tomar en cuenta: presencia de poblaciones microbianas sostenibles y con capacidad metabólica, condiciones ambientales adecuadas de crecimiento (p.

ej. oxígeno), temperatura adecuada (entre 0 y 40 °C), presencia de agua (humedad entre 50 – 70 %), cantidad adecuada de nutrientes y contaminantes, pH del medio (entre 6.5 – 7.5) (Volke & Velasco, 2002, págs. 18-19).

d. Caracterización del ecosistema

Los factores externos, en este caso ecosistema en general, también interviene en la selección del tipo de remediación. Entonces, se debe tener una descripción de aspectos como: ubicación geográfica, acceso al área, uso del suelo afectado, origen de la contaminación, distribución y alcance del contaminante, tipo de biodiversidad (vegetación y fauna), clima (temperatura), ciclo hidrológico, etc. (Volke & Velasco, 2002, pág. 12)

3.6.2.2 Parámetros durante el desarrollo de la biorremediación

Las condiciones adecuadas en un proceso de biorremediación son clave para un proceso exitoso, pero se debe tener un seguimiento de control del proceso. Hay ciertas condiciones que se deben mantener para que la biorremediación sea exitosa, a continuación se habla de ellas.

a. Temperatura

Esta propiedad es de suma importancia en la biorremediación ya que tiene influencia en la naturaleza física y química del contaminante, en este caso del petróleo y sus derivados. Además, se ve implicada en la alteración de la actividad metabólica y tasa de degradación de los microorganismos. Por ello, se recomienda que un proceso de biorremediación se lleve a cabo entre temperaturas de 35 – 37 °C (Gómez, y otros, 2008, págs. 80-81).

b. pH

El potencial de hidrógeno afecta el grado de recuperación de un suelo contaminado con hidrocarburos ya que se ve inmerso en una propiedad conocida como adsorción de iones en el suelo. Entonces, por ende afecta la solubilidad, disponibilidad, conformación y movilidad del hidrocarburo en el suelo. Además, los microorganismos también se ven afectados pues el pH afecta la disponibilidad de fuentes de carbono y energía. El pH en la biorremediación debe mantenerse entre 6 – 8 unidades de pH (Gómez, y otros, 2008, pág. 80).

c. Nutrientes

La presencia de nutrientes durante el proceso de biorremediación es de gran importancia pues de estos dependerá la actividad y metabolismo microbiano. La biodisponibilidad, asimilación y síntesis de minerales en el suelo permiten mayor eficiencia en el proceso de biorremediación. Además, una característica similar de los hidrocarburos es su alto contenido de carbono, por ello, cantidades adecuadas de macronutrientes (nitrógeno y fósforo) son determinantes en el crecimiento microbiano y tasa de degradación. En donde, se establece que una relación adecuada de macronutrientes sería de 100:10:1, en donde se hace referencia a C:N:P (Gómez, y otros, 2008, pág. 79).

d. Humedad

La humedad es una propiedad que limita de forma severa el proceso de biodegradación, dado que es el factor que actúa en el transporte de nutrientes y oxígeno. Es importante mantener un porcentaje de humedad no mayor al 70 % ni menor al 20 % de la capacidad de campo del suelo. Pues el exceso de humedad inhibe el crecimiento microbiano y reduce la tasa de intercambio gaseoso lo que puede generar condiciones anaerobias (Gómez, y otros, 2008, págs. 80-81).

e. Aceptores de electrones

La transferencia de electrones es fundamental en la biorremediación porque aumenta la actividad de los microorganismos, sean estos nativos o inoculados. Los aceptores preferidos por los microorganismos con el oxígeno y los nitratos pues obtienen mayor energía de ellos. Además, se sabe que en un proceso anaeróbico emplean sulfatos o dióxido de carbono C (Gómez, y otros, 2008, págs. 79-80).

3.6.2.3 Estrategias de Biorremediación

Las estrategias de biorremediación hacen referencia a todas las opciones de tecnologías que se tienen disponibles para remediar distintas áreas. Entre las cuales se mencionan las siguientes:

3.6.2.3.1 Bioestimulación

La bioestimulación es una técnica *In situ* en la que se adicionan nutrientes al área contaminada, principalmente fósforo y nitrógeno, para estimular el crecimiento de los microorganismos y por ende aumentando la tasa de degradación. La efectividad del proceso depende del sitio y magnitud de la contaminación, propiedades y naturaleza del contaminante, y factores limitantes (p. ej. oxígeno y nutrientes). Es una estrategia beneficiosa para áreas contaminadas por mercados industriales, pero no se recomienda su uso en suelos arcillosos, excesivamente heterogéneos y muy estratificados ya que la oxigenación no es adecuada (Zawierucha & Malina, *Bioremediation of contaminated soils: effects of bioaugmentation and biostimulation on enhancing biodegradation of oil hydrocarbons*, 2011, pág. 193).

3.6.2.3.2 Bioaugmentación

La bioaugmentación se basa en una técnica *In situ* de adición de cultivos de microorganismos pre aislados, con el fin de aumentar y especializar a la población microbiana, mejorar la tasa de degradación y reducir el tiempo y costo de degradación. Su uso se ha centrado en áreas contaminadas con insecticidas o herbicidas, y a su vez en la remoción de contaminantes de alta composición y concentración de metales (Fodelianakis, y otros, 2015, pág. 79).

3.6.2.3.3 Bioaireación

Esta técnica también llamada Bioventeo se lleva a cabo de forma *In situ*, consiste en la estimulación pasiva mediante gases (p. ej. metano y oxígeno) del proceso de biodegradación natural, por ende la actividad microbiana. Es precisa para el tratamiento de suelos orgánicos ya sean no volátiles o semi volátiles. Pero, la técnica acarrea una serie de desventajas consigo como: pérdida de nutrientes del suelo, requiere largos periodos de remediación para ser efectiva y la volatilización puede generar contaminación del ambiente aéreo (Torres & Zuluaga, 2009).

3.6.2.3.4 Landfarming

El término hace alusión al proceso *Ex situ* de arado en el suelo, pues la técnica se basa en colocar el contaminante en la zona arable del suelo (30 – 40 cm de alto). De esta manera se favorece la degradación aeróbica. Este proceso es mucho más económico que otras técnicas cuando la contaminación no es profunda, se reconoce que es menos favorable para la remoción de hidrocarburos pesados y que requiere de extensiones de terreno grandes para remediar el suelo (EPA, 2014, págs. 1-2).

3.6.2.3.5 Biopilas

Las biopilas son un tipo de tratamiento *Ex situ* de recuperación que consiste en reducir la concentración del contaminante, pero lo hace dentro de un sistema cerrado para el control de ciertos factores (p. ej. lixiviación, volatilidad, oxigenación y nutrientes). Este sistema cerrado de pilas se fabrica a partir de material biodegradable, compuesto del material contaminado y materia orgánica. Es un sistema favorable para compuestos contaminantes ligeros, y si la contaminación es profunda requieres de excavaciones lo que implica mayor costo (Jorgensen, Puustinen, & Suortti, 2012, págs. 245-246).

3.6.2.3.6 Compostaje

El compostaje ha sido el tratamiento *In situ* básico más común llevado a cabo en procesos de recuperación de suelos. Este se asemeja al tratamiento en lechos pues el suelo contaminado se mezcla con otros elementos naturales (p. ej. paja o aserrín), los mismos que aumentarán la porosidad y aireación. Además, se suele adicionar agentes espesantes que actúen como fuente de carbono extra y permitan el aumento de la actividad microbiana. De este proceso se obtiene un producto denominado *compost*, el mismo que tiene utilidad en la agricultura (Zeng, y otros, 2007, págs. 320-321).

3.6.2.3.7 Fitorremediación

Este tipo de remediación biológica se refiere al uso de las plantas como agentes descontaminantes de compuestos tóxicos. Las plantas que se emplean son aquellas cuyo metabolismo almacene o elimine estas sustancias (p. ej. arbustivas, algas, herbáceas o arbóreas). La fitorremediación es una estrategia de fitodescontaminación o fitoestabilización, es decir, liberación del contaminante o secuestro del contaminante, respectivamente (Hooda, 2007, págs. 367-368).

3.6.2.4 Estrategias que aumentan la biodegradación de hidrocarburos en el suelo

Muchas veces las áreas contaminadas no presentan las condiciones adecuadas para establecer o aplicar una de las estrategias antes mencionadas, o no favorecen los resultados de remediación. Como consecuencia de ello, se han desarrollado e investigado otras estrategias alternativas de biorremediación. Entre estas alternativas cabe mencionar tres, surfactantes, cosustratos y consorcios microbianos (Fodelianakis, y otros, 2015, pág. 78).

3.6.2.4.1 Surfactantes

Los surfactantes son compuestos anfifílicos que reducen la energía libre de un sistema mediante la sustitución de las moléculas de alta energía en una interfaz. Son usados para el lavado del suelo debido a su capacidad de movilizar contaminantes. Los surfactantes se han usado industrialmente como agentes adhesivos, floculantes, humectantes, espumantes, demulsificantes y penetrantes. La industria petrolera es su principal usuario ya que aumentan la solubilidad de petróleo y sus derivados, y la biodisponibilidad de compuestos orgánicos hidrofóbicos. Por ello, se han empleado en descontaminación de agua y suelo (Reis, Pacheco, Pereira, & Freire, 2015, pág. 36).

Ciertos surfactantes conocidos como biosurfactantes se caracterizan por ser producidos por bacterias o levaduras a partir de sustratos como azúcares, aceites, alcanos y residuos. Los biosurfactantes se agrupan como glicolípidos, lipopéptidos, fosfolípidos, ácidos grasos, lípidos neutros y compuestos poliméricos y particulados. Además, se conoce que el grupo de biosurfactantes que más se ha estudiado son los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* (Mulligan, 2005, págs. 183-187).

3.6.2.4.2 Cosustratos

La adición de sustratos extras dentro de un área contaminada ha sido una estrategia muy usual en la degradación de hidrocarburos en suelos y sedimentos. Estos cosustratos podrían aumentar la presencia de bacterias y hongos, esto se da como efecto de que varía la relación carbono-nitrógeno, lo que favorece el crecimiento microbiano y la actividad enzimática. Dentro de los cosustratos empleados están la glucosa, extracto de levadura, cascara de arroz, desechos de trigo, metanol, etanol, etc. (Chang, Chang, & Yuan, 2008, pág. 145).

Sin embargo, los cosustratos pueden tener un efecto adverso al deseo porque desempeñan un papel de competencia con el contaminante. Así, la ruta de remediación se altera ya que los microorganismos pueden aumentar su preferencia por el cosustrato como fuente de carbono y energía, lo que reduce la remoción o descomposición del compuesto contaminante (Lu, Xhang, & Fang, 2011, págs. 1365-1366).

3.6.2.4.3 Consorcios Microbianos

Un consorcio microbiano es una agrupación natural de poblaciones microbianas de diferentes especies o géneros que conviven conjuntamente como en una asociación. Es importante saber que los microorganismos involucrados en un consorcio microbiano coexisten siempre que las condiciones metabólicas y ecológicas sean compatibles. También, la resistencia a periodos de escases de nutrientes y cambios de condiciones ambientales, son más fáciles de con llevar por un consorcio microbiano. Este fenómeno de resistencia se da gracias a la diversidad de especies, lo que implica diversidad metabólica disponible (Ochoa & Montoya, 2015).

Además, este tipo de asociaciones tienen la finalidad de repartirse funciones, beneficiarse sinérgicamente en actividades como el crecimiento y flujo de

nutrientes, además de efectuar funciones complejas que no se pueden llevar a cabo por una población individual. La robustez en estos factores se da debido a al proceso de comunicación que existe entre los miembros de la asociación, en donde hay señales físico químicas o moleculares que facilitan su convivencia (Ochoa & Montoya, 2015, págs. 60-61).

3.7 Uso de Microorganismos en Biorremediación

La biorremediación mediada por microorganismos es una tecnología muy prometedora que es amigable, segura y eficaz. Las comunidades microbianas encontradas en áreas contaminadas son aquellas que tienen la capacidad o se han adaptado a sobrevivir en estas condiciones tóxicas de hidrocarburos. Por lo general, la diversidad microbiana de un área contaminada depende de la composición y complejidad del contaminante, además de la duración del tratamiento (Volke, 2002, págs. 25-26).

Los contaminantes dentro del metabolismo de las bacterias tienen distintos comportamientos, pueden actuar como sustratos primarios o sustratos secundarios, y también provocar cometabolismo. Un compuesto es un sustrato primario cuando es la fuente de energía primordial y suficiente para los microorganismos, mientras que es un sustrato secundario cuando proporciona energía al microorganismo pero no es suficiente ni adecuada. Por otro lado, el cometabolismo se da cuando el compuesto es metabolizado por el microorganismo, pero a la vez toma energía de otro compuesto diferente (Volke, 2002, págs. 28-29).

Los microorganismos transforman los contaminantes a través de procesos enzimáticos y metabólicos, los mismos que varían ampliamente dependiendo del microorganismo en cuestión. El proceso de degradación aeróbico emplea el hidrocarburo como sustrato y en presencia de oxígeno, genera productos finales que son biomasa celular, agua y dióxido de carbono. Mientras, en un proceso anaeróbico emplean el hidrocarburo como sustrato pero su aceptor de

electrones serán nitratos, sulfatos e incluso dióxido de carbono. Por ello, sus productos finales son biomasa celular, dióxido de carbono e iones liberados (p. ej. nitrógeno, manganeso, hierro, azufre y metano) (Maroto & Rogel, 2015, págs. 297-298) .

Dado que el petróleo es una mezcla compleja de compuestos alifáticos, alicíclicos y aromáticos, los microorganismos emplean distintas vías de degradación. Por consiguiente, el requerimiento de energía y fuente de carbono de los distintos microorganismos generan diferentes poblaciones degradadoras (Iturbe & López, 2015, págs. 7-8). A continuación se habla del sistema de degradación aeróbica de hidrocarburos alifáticos por fines de interés en el proyecto realizado.

3.7.1 Sistemas de degradación de hidrocarburos alifáticos

Los alcanos, alquenos y alquinos están conformando a los hidrocarburos alifáticos. La conformación de los hidrocarburos alifáticos es variada no solo en el número de enlaces, sino también en número de carbonos que conforman la longitud de la cadena y también las ramificaciones del mismo. Es muy importante conocer la estructura y conformación de los hidrocarburos, pues son factores que interfieren en el mecanismo de degradación de los microorganismos (Vega & Hernandez, 2012, pág. 2).

3.7.1.1 Degradación de alcanos en condiciones aeróbicas

Los alcanos tienen una estructura similar a la de los ácidos grasos y las parafinas vegetales, y su ventaja está en que los microorganismos los prefieren como fuente de carbono lo que estimula que su degradación sea más fácil. Los microorganismos que emplean los alcanos como sustrato tienen dos vías metabólicas para la degradación. La más común es la vía mono oxigenasa y la otra es vía di oxigenasa, en ambos casos al finalizar el proceso se forma un ácido graso (Castillo, 2005, pág. 429).

similar a la mono oxigenasa, es decir, con el complejo multi enzimático y a partir de hidropéroxido se transformará el compuesto en un alcohol, cetona, éster, aldehído y finalmente carboxilo. Posteriormente, interviniendo la ruta de β -oxidación para degradar la molécula de carácter similar a un ácido graso obtenida (Rojo, 2009, págs. 2478-2481).

3.8 Especies de microorganismos degradadores de hidrocarburos

La biodegradación de hidrocarburos es llevada a cabo principalmente por las bacterias, pero también están involucrados los hongos, levaduras y algas. Pocas especies de bacterias y demás microorganismos logran metabolizar hasta un cien por ciento del hidrocarburo, pero otros solo degradan un número y porcentaje limitado de hidrocarburos. Por ello, los consorcios bacterianos o microbianos son esenciales para degradar mezclas complejas como el crudo (López, y otros, 2006, pág. 86).

Dentro de las especies bacterianas de mayor interés y uso en los procesos de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos tenemos *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Corybacterium*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, entre otros. Mientras, dentro de la micoremediación, es decir, el uso de hongos que degraden hidrocarburos podemos encontrar los géneros, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Hormoconis*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Mycobacterium*, entre otros. Además, dentro de las levaduras podemos encontrar *Saccharomyces* y *Candida* (López, y otros, 2006, págs. 86-89).

3.8.1 Casos de estudio con determinadas especies de microorganismos degradadores de hidrocarburos en América Latina

Los principales países que reportan contaminación severa con hidrocarburos son aquellos que dependen aún del petróleo como sustento económico y social. En América Latina tenemos a Venezuela, México, Brasil, Argentina,

Colombia y Ecuador. Existen varios reportes alrededor de estos países en cuanto a biorremediación de suelos empleando microorganismos, en donde además es considerada como una solución compatible y amigable con el ambiente (Schmidt, 2012, pág. 1).

En el 2014, el Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de Los Andes de Bogotá reportó el estudio desde 1990 de la bacteria llamada *Lysinibacillus sphaericus*. Esta tiene la capacidad de degradar hidrocarburos y ya ha sido aplicada en campo de la industria del petróleo en Colombia. Su efectividad de degradación es del 95 % en un tiempo de máximo 3 meses, y los resultados de los ensayos desde ese año han sido sorprendentes (Manchola & Dussán, 2014, pág. 85).

Otro estudio en Argentina el año 2010 por Acuña y sus colaboradores del Centro de Estudios e Investigación en Microbiología Aplicada de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. En este realizaron el estudio del potencial de degradación de microorganismos provenientes de suelos recuperados de un sistema de biorremediación en proceso. Dentro de sus resultados recalcan la actividad degradadora de los géneros microbianos *Rhododoccus*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Brevundimonas* y *Pseudomonas*. Siendo estos los de mayor actividad involucrada en la degradación de hidrocarburos alifáticos como kerosén y gasolina (Acuña, Pucci, Morales, & Pucci, 2010, págs. 29-30).

Por otro lado, un reporte general de un estudio en México de casos realizado en el 2014 por García Cruz y colaboradores, remarca la diversidad microbiana encontrada en el Golfo de México a lo largo de estudios llevados a cabo en los años 2011 y 2013 en zonas costeras como la de Florida, Campeche, Veracruz, etc. Aquí se han encontrado alrededor de 14 géneros de especies con 24 ejemplares distribuidos en ellos que tienen la capacidad de degradar hidrocarburos. Entre los géneros encontrados están *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Micrococcus* (García & Aguirre, 2014, págs. 645-647).

3.8.2 Aplicación de microorganismos degradadores de hidrocarburos en Ecuador

En el Ecuador, especialmente en la región amazónica del país, se aplican tecnologías y estrategias de biorremediación desde el año 1990 con el fin de tratar suelos contaminados con hidrocarburos. Pero, para ese entonces la biorremediación no había circulado en el mercado como una estrategia de vanguardia. Sino fue hasta hace unos 20 años, que la tecnología recién fue legitimada en Estados Unidos y además fue el momento en el que Ecuador se convirtió en un país en alerta roja por el nivel de contaminación a causa de la industria hidrocarburífera (Cuvi & Bejarano, 2015, pág. 9).

Como la mayoría de suelos amazónicos están contaminados con petróleo crudo, su remoción se realiza *ex situ* mediante dos estrategias: compostaje y landfarming. En donde, para ambas tecnologías se aplica en gran cantidad microorganismos previamente estudiados en laboratorio, sean estos bacterias, hongos, levaduras, y además de moléculas como enzimas o componentes celulares. La iniciativa de emplear microorganismos en este contexto fue ideada por la petrolera Maxus, tras el éxito que había ganado esta idea en descontaminación marina (Atlas & Hazen, 2011, pág. 6709).

Maxus fue la primera empresa en explotar petróleo en el Parque Nacional Yasuní, por ello, junto con la Escuela de Biología de la Pontífice Universidad Católica del Ecuador (PUCE) montaron estudios de remediación ambiental que incluían consultorías del área en cuestión. Por otro lado, en 1996 la Facultad de Ingeniería en Geología, Minas, Petróleos y Ambiental (FIGEMPA) de la Universidad Central del Ecuador (UCE) logró aislar una bacteria llamada por su seudónimo “Rambo”, la misma que era capaz de degradar hidrocarburos recalcitrantes (Cuvi & Bejarano, 2015, pág. 16) .

Más tarde, para 1998 la Comunidad Europea junto con el equipo del proyecto Explotación Petrolífera y Desarrollo Sostenible en la Amazonía Ecuatoriana (PETROMAZ) contratan los servicios de la PUCE para remediar el Parque Cuyabeno. La intervención fue positiva y generó resultados líderes que abrieron las puertas a futuros contratos con empresas privadas y también Petroecuador (Cuvi & Bejarano, 2015, pág. 13) .

En el 2004, las investigaciones de la UCE fueron centralizadas en el Laboratorio de Ciencias Biotecnológicas (LACIB) en Sacha Central. Luego para el año 2006 el grupo de investigadores aliados a la PUCE crea su propia consultora ambiental. Ese mismo año se crean otras cinco empresas consultoras de biorremediación lo que expandió el mercado y las puso en auge por un periodo de tiempo mediano (Cuvi & Bejarano, 2015, pág. 17) .

Sólo un año después EP PRETROECUADOR a través de Petroproducción pone en marcha el Proyecto de Eliminación de Pasivos Ambientales en el Distrito Amazónico (PEPDA) en un convenio con Ingenieros en Biotecnología de la ESPE. Este proyecto debía lograr el reto de remediar las contaminaciones de suelos amazónicos desde aquellas provocadas por Texaco. El desafío provocó la creación del Centro de Investigación de Tecnologías Ambientales (CITVAS) para que ayudara en la mitigación (Ministerio del Ambiente, 2015, págs. 15-16).

CITVAS en el año 2010 ya operaba los procesos de biorremediación con tecnologías más avanzadas. Pero tras siete años de experiencia en el área, las decisiones de EP PETROECUADOR sobre CITVAS no emprendían interés pues no se habían hecho patentes ni publicaciones de las investigaciones y resultados llevados a cabo (Ministerio del Ambiente, 2015, págs. 14-15).

Pero para el 2013 delimitan que el CITVAS solo había remediado 538 fuentes de contaminación. Por lo que el Ministerio del Ambiente toma la decisión de poner en marcha el Plan de Restauración Integral de Pasivos Ambientales en

el Distrito Amazónico (PRIPA), basándose en el Programa de Reparación Ambiental y Social (PRAS) (Ministerio del Ambiente, 2015, págs. 14-15).

Desde entonces, las actividades e investigaciones de biorremediación en el Ecuador se dan por medio del Proyecto Amazonía Viva que está a cargo de Petroamazonas (Petroamazonas EP, 2016).

4. CAPÍTULO III: DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

El presente proyecto se desarrolló dentro de un enfoque integrado multimodal (cualitativo-cuantitativo) de forma experimental, con el fin de identificar microorganismos en suelos contaminados que degraden hidrocarburos y establecer su cinética de degradación. Se basó en el estudio de la relación que tiene la cepa de microorganismo empleado (variable independiente) con la tasa de crecimiento, tiempo de vida media, tasa de degradación y eficiencia (variables dependientes).

Se llevó a cabo en cinco etapas experimentales. La primera etapa se realizó en pasivos de terrenos privados de la Comunidad de Lumbaqui. Mientras, el resto de etapas se realizaron en las instalaciones de la Universidad de las Américas, en el laboratorio de Ingeniería Ambiental. Cabe mencionar que todo el desarrollo científico del proyecto se llevó a cabo bajo la dirección del tutor científico, MsC. Miguel Gualoto PhD, Docente de Ingeniería Ambiental de la UDLA.

De esta manera, la primera parte de la investigación se basó en la determinación de la muestra y muestreo. Luego, la segunda etapa abarca el aislamiento de bacterias mediante cultivos mixtos y puros, e identificación morfológica empleando la Prueba de Tinción Gram. Después, se seleccionó los microorganismos con potencial capacidad de degradación de hidrocarburos mediante un ensayo de turbidez, en presencia del hidrocarburo seleccionado para el estudio, gasolina blanca. Posteriormente, se identificó el género de los microorganismos ensayados mediante un sistema de pruebas bioquímicas. Finalmente, se efectuó un ensayo de degradación a condiciones físico-químicas establecidas, en presencia del mismo hidrocarburo, adicional en esta etapa, se realizó la cuantificación de CO₂ liberado por del proceso de degradación del hidrocarburo de cada uno de cultivos puros ensayados, mediante una prueba de reacción colorimétrica con un indicador. A partir de la información obtenida se determinó la cinética de degradación de cada uno de

los microorganismos, los mismos que fueron identificados mediante curvas estadísticas de eficiencia. (La temperatura a la que se llevó a cabo todo el estudio, a partir de la segunda etapa, fue de 37° C).

Adicionalmente para el análisis estadístico se llevó a cabo una prueba de normalidad de los datos en donde se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. A partir de los datos con comportamiento normal se realizó un análisis de varianza factorial de modelo lineal general Univariante, y se analizó además con una prueba de Tukey. Mientras para los datos que no tenían comportamiento normal se efectuó una Prueba no paramétrica, y se analizó con una prueba de Kruskal-Wallis.

A continuación en la *Figura 10* se detalla el diagrama de flujo que se utilizó para el levantamiento de la información del presente proyecto; en el mismo se puede visualizar cada uno de los procesos y pruebas que se realizaron a las muestras obtenidas, que me permitieron obtener los mejores resultados y cumplir con los objetivos planteados.

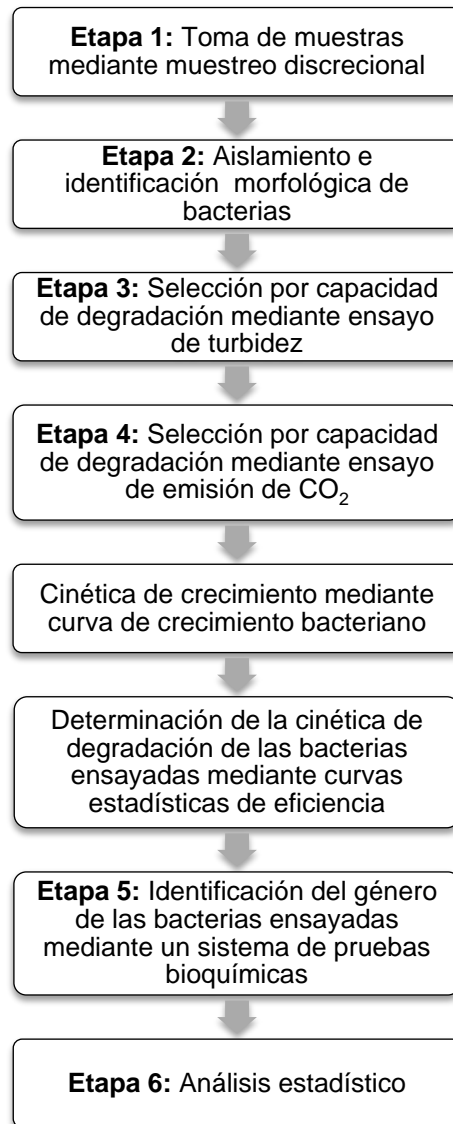


Figura 10. Diagrama de Flujo del procedimiento seguido en el proyecto.

5. CAPÍTULO IV: PROCEDIMIENTOS

5.1 Etapa 1: Determinación de la población y muestreo

El estudio se llevó a cabo en pasivos existentes en terrenos privados de la Comunidad de Lumbaqui que poseen contaminación por hidrocarburos a causa de derrames que ha sufrido la Estación Lumbaqui, por la ruptura en varios tramos del Sistema Oleoducto Transecuatoriano (SOTE) desde el año 1980 (Jarrín, Espín, & Mancheno, 2013) .

Los suelos del lugar han sido descritos como suelos *Typic Dystropepts*, es decir, distribuidos en colinas, de textura franco arcillosa, bien drenados, de baja fertilidad, bajo intercambio catiónico, profundos, fuertemente ácidos, niveles críticos de elementos como calcio, magnesio, potasio, fósforo y saturación de aluminio (Pantoja, 2012).

El pasivo seleccionado para el estudio pertenece al señor Guillermo Quezada, propietario privado del terreno, el mismo está ubicado detrás de los tanques del bloque 11 de la empresa TECPECUADOR. Se estableció un muestreo discrecional, basado en la observación de los siguientes parámetros: migración lateral de las paredes del pasivo, presencia o ausencia de vegetación sobre el área contaminada, presencia de crudo intemperizado.

En el lugar, se tomó ocho sub muestras y una muestra testigo de suelo, esta última obtenida del mismo terreno en un lugar no contaminado por hidrocarburos. De las ocho sub muestras se formó dos muestras compuestas y una muestra simple. La primera muestra compuesta (*Muestra 1*) se obtuvo de la mezcla de los puntos de recolección 1, 2, 3 y 4, mientras la segunda muestra compuesta (*Muestra 2*) se obtuvo de la mezcla de los puntos de recolección 5, 6 y 7. La muestra simple (*Muestra 3*) provino del punto de recolección 8. Además, en el punto 2 (*Muestra 4*) y 3 (*Muestra 5*) se tomó una muestra de suelo intemperizado de cada uno. La muestra testigo fue denominada (*Muestra*

6). Las muestras se almacenaron en bolsas ziplox estériles y a 4 °C hasta su transporte al laboratorio.

Algunas imágenes de las muestras tomadas se adjuntaron en el *Anexo 1*, donde se puede apreciar el suelo contaminado con hidrocarburos y suelo con crudo itemperizado, además del lugar de muestreo. A continuación en la *Tabla 5* se establece la descripción de las muestras que serán objeto del estudio, junto con las coordenadas geográficas en sistema latitud-longitud y formato *DMS* (siglas de su significado en inglés, *Degree:Minute:Second*) de los puntos de muestreo.

Tabla 5.

Descripción de las muestras objeto del estudio.

Muestra	Punto de muestreo	Coordenadas	Descripción
Muestra 1	1	N 00° 03.222' W 077° 18.663'	Suelo contaminado con hidrocarburo, suelo arcilloso.
	2	N 00° 03.227' W 077° 18.657'	
	3	N 00° 03.231' W 077° 18.653'	
	4	N 00° 03.240' W 077° 18.662'	
Muestra 2	5	N 00° 03.159' W 077° 18.664'	Suelo contaminado con hidrocarburo, suelo arcilloso.
	6	N 00° 03.154' W 077° 18.664'	
	7	N 00° 03.145' W 077° 18.661'	

Muestra 3	8	N 00° 03.103' W 077° 18.626'	Suelo contaminado con hidrocarburo, suelo limoso.
Muestra 4	2	N 00° 03.227' W 077° 18.657'	Suelo de crudo intemperizado, suelo arcilloso.
Muestra 5	3	N 00° 03.231' W 077° 18.653'	Suelo de crudo intemperizado, suelo arcilloso.
Muestra 6	9	N 00° 03.297' W 077° 18.712'	Muestra testigo, suelo no contaminado con hidrocarburos.

Adicionalmente, en la *Figura 11* se presenta un esquema del área de muestra con imágenes reales del lugar de muestreo.

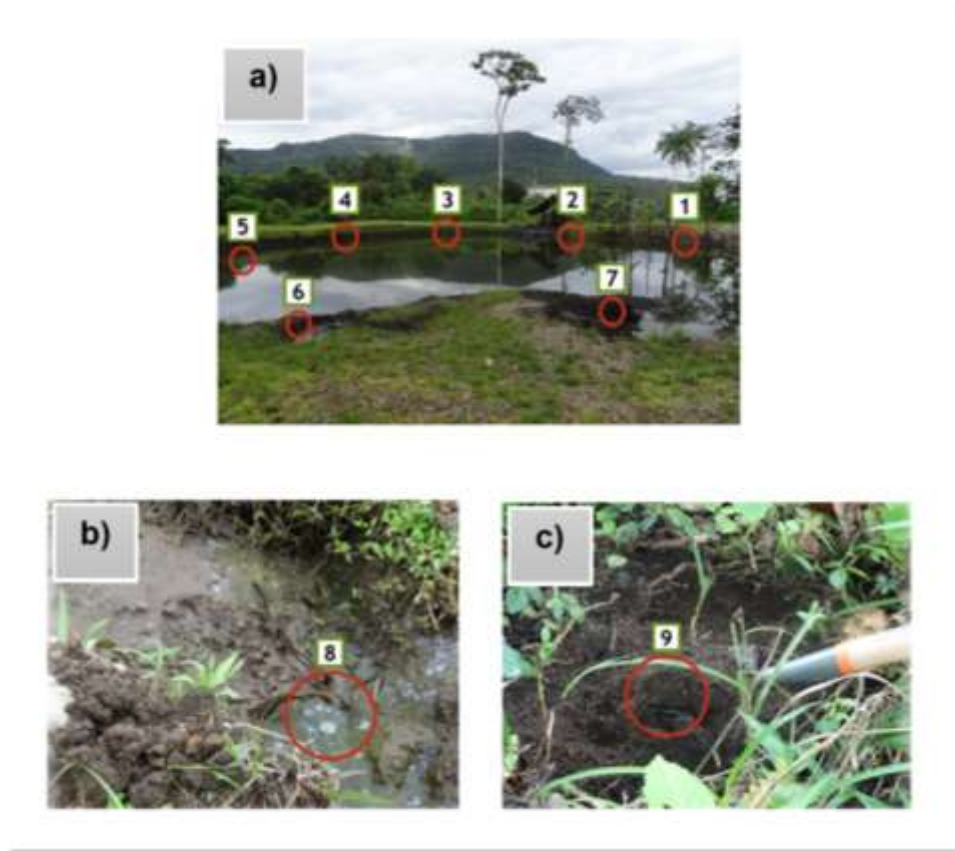


Figura 11. Esquema de muestreo de los puntos de recolección.

- a) Representa los puntos de muestreo 1-7 de suelo arcilloso que se tomó en el pasivo.
- b) Es específicamente el punto de muestreo 8 donde se tomó la muestra del suelo limoso.
- c) Indica el punto de muestreo 9 donde se tomó la muestra testigo.

5.2 Etapa 2: Aislamiento de bacterias e identificación morfológica

A partir de las muestras de suelos recolectadas se realizó una siembra de cultivo mixto. Para esto se preparó 6 diluciones ($10^{-1} - 10^{-6}$) en solución salina al 0,9 % a partir de 1 g de cada una de las seis muestras, luego se tomó 5 μL de cada una de ellas y se sembró en cajas Petri con agar nutritivo (Medio deshidratado, CULTIMED). Se dejó incubar por 48 horas las diluciones $10^{-1} - 10^{-3}$ y 72 horas las diluciones $10^{-4} - 10^{-6}$. A continuación en la *Figura 12* se muestra gráficamente el procedimiento que se realizó con cada una de las muestras de suelo para obtener cultivos mixtos.

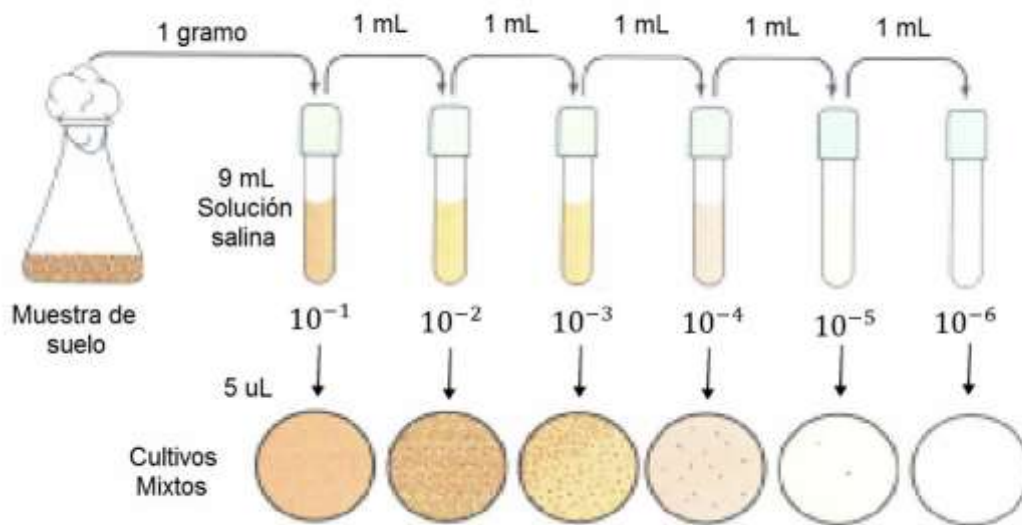


Figura 12. Procedimiento de aislamiento bacteriano para obtener cultivos mixtos.

Posteriormente, se realizó cultivos puros a partir de las colonias obtenidas en el cultivo mixto. Para obtener el cultivo puro se realizó dos tipos de siembra distintos, por estriado a partir de media colonia, y por enriquecimiento del resto de colonia en 10 mL de caldo nutritivo. Del caldo nutritivo se tomó 5 μ L y se realizó siembra masiva con asa de Drigalski. Se dejó incubar por 72 horas. A continuación en la *Figura 13* se muestra gráficamente el procedimiento llevado a cabo para obtener cultivos puros a partir de distintas colonias de los cultivos mixtos previamente realizados.

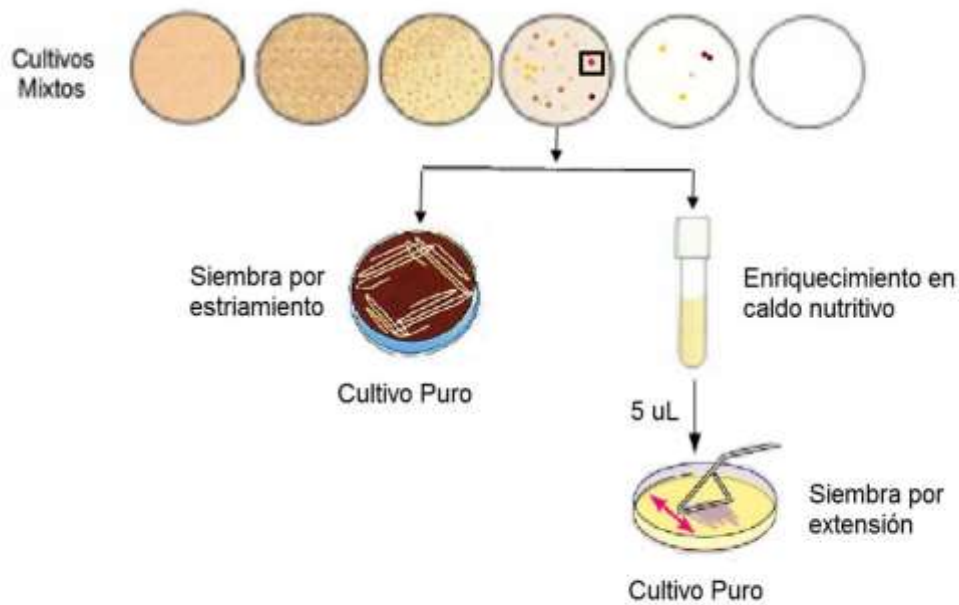


Figura 13. Procedimiento de aislamiento bacteriano para obtener cultivos mixtos.

Una vez obtenidos los cultivos puros se realizó Tinción Gram para determinar la morfología de las colonias seleccionadas.

5.3 Etapa 3: Ensayo de turbidez

Para esta etapa se inoculó previamente cada colonia pura en 10 mL de caldo de peptona y se dejó incubar por 72 horas. Además, se preparó una solución salina nutritiva para el ensayo, la misma que se basó en el protocolo especificado por Gualoto (2015) con ciertas modificaciones. La solución nutritiva contenía los siguientes compuestos disueltos en agua de destilada: KH_2PO_4 (85 mg/L), K_2HPO_4 (217,5 mg/L), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (334 mg/L), NH_4Cl (25 mg/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (22,5 mg/L), CaCl_2 (27,5 mg/L); $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0,25 mg/L), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,0399 mg/L), H_3BO_3 (0,0572 mg/L), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (0,0347 mg/L) y extracto de levadura (0,15 mg/L).

Una vez preparada la solución se montó el experimento en tubos de ensayo. Cada tubo de ensayo contenía 10 mL de la solución nutritiva, 1 mL del cultivo

en caldo de peptona y 1 mL de gasolina blanca. El ensayo de turbidez se llevó a cabo por triplicado para cada cultivo puro diferente obtenido. A continuación en la *Figura 14* se muestra el esquema del ensayo de turbidez.

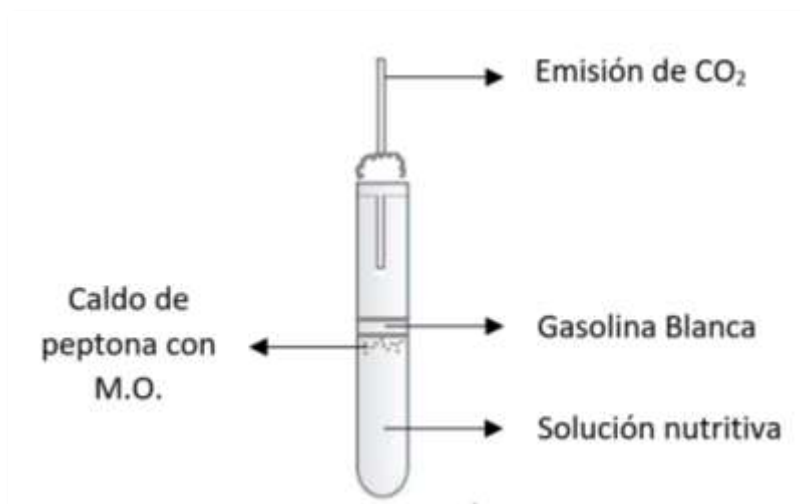


Figura 14. Esquema de ensayo de turbidez usado para cada colonia pura por triplicado.

Una vez montado el ensayo se mantuvo un control de la turbidez, midiendo Unidades Nefelométricas de turbidez (*NTU's*, de su significado en inglés *Nephelometric Turbidity Unit*) durante 50 días, se midió a los 7, 14, 21, 28, 46 y 50 días. Al finalizar el periodo de este ensayo, se seleccionó las bacterias con mayor tasa de turbidez realizado un promedio de los datos tomados por cada bacteria.

5.4 Etapa 4: Identificación de bacterias

Una vez seleccionadas las bacterias al finalizar la etapa 3, se procedió a realizar las pruebas bioquímicas para identificación del género en cuestión. Para ello se emplearon dos sistemas de identificación de bacterias marca *Liofilchem®*. Se empleó el Sistema de Identificación de *Staphylococcus spp*, conocido comercialmente como *STAF SYSTEM 18R*. Y también se empleó el

Sistema de Identificación de Enterobacterias Gram negativas, Oxidasa negativas, conocido comercialmente como *ENTEROSYSTEM 18R*.

Con el Sistema de Identificación *STAF SYSTEM 18R*, se llevaron a cabo 18 pruebas bioquímicas: descarboxilación de arginina, hidrólisis de urea, producción de acetoina, reducción de nitratos, hidrólisis de ONPG, resistencia a novobiocina, y fermentación de maltosa, trealosa, manitol, xilosa, xilitol, celobiosa, sucrosa, manosa, ribosa, rafinosa, lactosa y fructosa.

Mientras, con el Sistema de Identificación *ENTEROSYSTEM 18R*, se llevaron a cabo 13 pruebas: descarboxilación de lisina, ornitina, fenilalanina y citrato, producción sulfuro de hidrogeno, utilización de malonato, prueba VP, Prueba Indol y fermentación de glucosa, inositol, sorbitol, sacarosa y arabinosa.

Adicionalmente, se realizó siembra en agar McConkey y pruebas bioquímicas de catalasa y de oxidasa.

5.5 Etapa 5: Tasa de crecimiento bacteriano y Tasa de degradación

En este ensayo se midieron varias variables con el objetivo de determinar la cinética de degradación de las bacterias seleccionadas. Se basó en la medición de la tasa de crecimiento bacteriano, tiempo de vida media del residuo, tasa y eficiencia de degradación (variables dependientes).

Para poder medir todas las variables dependientes se diseñó un ensayo como se muestra en la *Figura 15*. Se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL, que contenía 100 mL de la solución salina nutritiva, 1 mL de la solución salina nutritiva con microorganismos inoculados (provenientes del ensayo de

turbidez) y 1 mL de gasolina blanca cuya concentración era de 261891 ppm (¹). El matraz contaba con dos tubos de escape, el uno para recolección de volúmenes del inóculo para estudiar la tasa de crecimiento microbiano (Tubo A), y otro conectado a un frasco plástico (Tubo B). El frasco plástico contenía 100 mL de hidróxido de sodio 1 N. Este mismo frasco disponía un tubo de escape (Tubo C) para recolectar volúmenes de la solución que contenía, la cual permitió obtener datos para el cálculo de la tasa de degradación, tasa de vida media y eficiencia. Nota: Los tubos A y C se abrían solo al momento de recolectar los volúmenes.

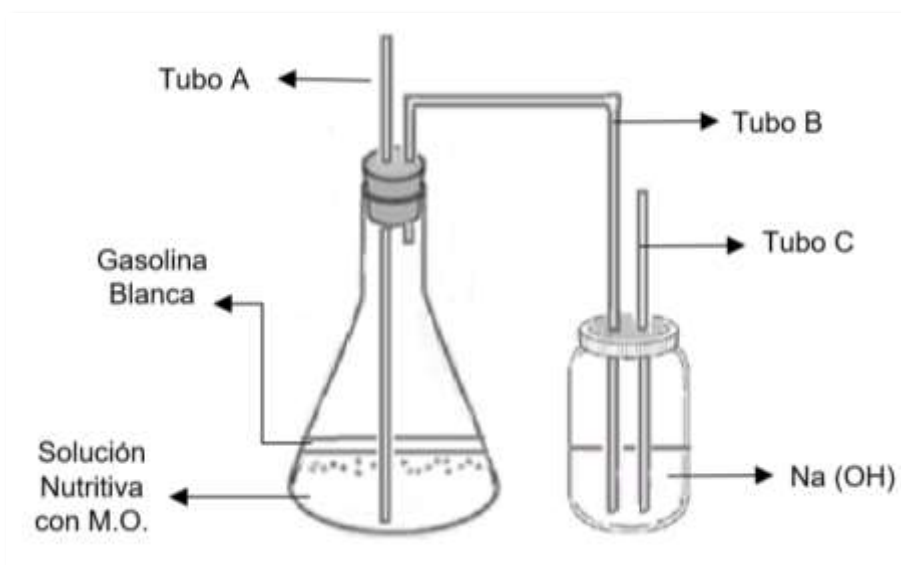


Figura 15. Esquema de ensayo de degradación usado para cada bacteria seleccionada por triplicado.

Tubo A: Toma de muestra para tasa de crecimiento bacteriano, Tubo B: Emisión de CO₂ que reacciona con el hidróxido de sodio y Tubo C: Toma de muestra para tasa de degradación, tasa de vida media y eficiencia.

¹ La concentración de la gasolina blanca se determinó a partir de un análisis de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP's) llevado a cabo por el laboratorio ChávezSolutions Ambientales Cía. Ltda. El informe se adjunta en el Anexo 2.

- **Tasa de crecimiento bacteriano**

La tasa de crecimiento bacteriano se estudió a partir de conteo de colonias en agar nutritivo (Medio deshidratado, CULTIMED). A partir del Tubo A se tomó un volumen de 5 μL y se sembraron en agar nutritivo (Medio deshidratado, CULTIMED) y se dejó incubar por 24 horas para el conteo de colonias presente. El proceso mencionado se realizó durante 28 días, se tomó muestra a las 4 y 24, horas, luego a los 6 días, y luego cada 7 días hasta cumplir los 28 días.

El crecimiento microbiano es el número de células o unidades formadoras de colonia (UFC's) en función del tiempo, para su determinación se emplea la *Ecuación 1* indicada a continuación:

$$\mu = \frac{\text{Ln}(N_2) - \text{Ln}(N_1)}{t_2 - t_1} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde: μ es tasa de crecimiento microbiano, N_1 es el número de UFC's/ml al t_1 de 4 horas, N_2 es el número de UFC's/mL al t_2 de 24 horas.

Además, se determinó el tiempo de duplicación de cada cepa ensayada. Se usó la *Ecuación 2* mostrada a continuación:

$$td = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde: td es el tiempo de duplicación.

- **Tasa de degradación a través de emisión de CO_2**

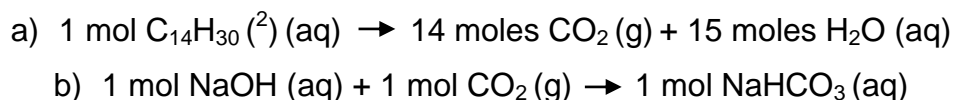
Para determinar la tasa de degradación se usó una técnica de medición indirecta basada en la medida de la absorbancia de la fenolftaleína (método colorimétrico) a una longitud de onda de 550 nm. La absorbancia varía dependiendo de la concentración del hidróxido de sodio, y la concentración de

esta base varía dependiendo de la concentración de CO₂ liberado en el proceso de mineralización del hidrocarburo (Gasolina blanca). Entonces, para ello se analizó la solución de hidróxido de sodio 1 N que se tenía en el frasco conectado a través del Tubo C al matraz Erlenmeyer. Se realizó las mediciones por un periodo de 28 días, cada 7 días hasta completar el período mencionado.

Cabe recordar que la concentración inicial de la Gasolina blanca fue obtenida a partir de un análisis de laboratorio mencionado en la pág. 69. Mientras la concentración de Gasolina blanca consumida y remanente que se pauta en resultados, fue calculada en unidades de ppm a partir de la reacción química detallada más adelante en esta misma página (pág. 72).

Previamente se realizó una curva estándar de la absorbancia de la fenolftaleína. Para ello, se preparó siete soluciones de hidróxido de sodio a distintas concentraciones (1 N, 0.8 N, 0.6 N, 0.4 N, 0.2 N, 0,1 N y 0,05 N), se tituló para comprobar su concentración. Posteriormente, se realizó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro, para ello, se colocó una gota de fenolftaleína a la solución al 1 N de concentración y se realizó inmediatamente la lectura. Así, se procedió con todas las demás soluciones y se trazó la curva.

Una vez obtenida la ecuación de la pendiente de la curva y calculados los datos de concentración a partir de la absorbancia, se procedió a realizar una relación estequiometria para conocer la cantidad de CO₂ liberado, basada en la siguiente reacción química:



² Por bibliografía ya mencionada sobre la composición de la gasolina blanca, se sabe que tiene una concentración de 90 – 100 % de Queroseno. Por ello, se ha tomado la fórmula química promedio de este compuesto para realizar la estequiometria.

Adicionalmente, para determinar la tasa de degradación de cada una de las colonias, se empleó la *Ecuación 3* detallada a continuación.

$$k = \frac{\ln \frac{N_0}{N_1} - \ln \frac{N_0}{N_f}}{t_f - 1} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde: k es la tasa de degradación, N_0 es la concentración inicial del hidrocarburo antes de iniciar el ensayo, N_1 es la concentración del hidrocarburo en la medición al t_1 , N_f es la concentración del hidrocarburo en la medición al t_f ($N_f \neq 0$, si ha cierto tiempo la concentración del hidrocarburo medida es igual a 0 debe tomarse la concentración y tiempo anterior a este).

- **Tiempo de vida media**

El tiempo de vida media, fue un parámetro empleado para conocer el consumo de la gasolina blanca a lo largo del tiempo. Es decir, determinar a qué tiempo está consumido el 50 % de la concentración del hidrocarburo. Para lo cual se empleó la *Ecuación 4* mostrada a continuación:

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{k} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde: $t_{1/2}$ es el tiempo de vida media.

5.6 Etapa 6: Estadística

Para determinar la relación que existe entre la variable dependiente y las variables independientes, se compararon los datos obtenidos utilizando el programa SPSS Statistics. En donde, se analizó la existencia de una diferencia significativa entre las bacterias seleccionadas a los distintos periodos ensayados, tanto para la cinética de crecimiento como para la cinética de degradación.

- **Análisis estadístico Etapa 3: Ensayo de turbidez**

En primera estancia se llevó a cabo una prueba de normalidad de los datos de cinética de crecimiento, para la cual se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov con un (alfa) de $\alpha=0,05$. Los datos con un comportamiento normal fueron sometidos a un análisis de varianza factorial de modelo lineal general Univariante de 12 x 6 (Factor Colonia con 12 niveles (A,B,C,D,E,F,G,H,J,K,L,M) y Factor Tiempo con 6 niveles (7, 14, 21, 28, 46, 50 días)), y se analizó además empleando una prueba de Tukey. Mientras los datos que no presentaron comportamiento normal fueron sometidos a una Prueba no paramétrica, se analizó empleando la prueba de Kruskal-Wallis.

A partir de estos análisis se clasificó las colonias en subconjuntos de acuerdo a su comportamiento en los distintos periodos de tiempo, para posteriormente poder seleccionar aquellas con un comportamiento de crecimiento bacteriano significativamente diferente del resto de colonias. Además para poder visualizar este análisis estadístico, se realizó un gráfico de dispersión de las colonias a partir de un promedio de NTU's de los datos obtenidos de las 3 repeticiones realizadas para cada colonia.

- **Análisis estadístico Etapa 5: Tasa de crecimiento bacteriano y Tasa de degradación**

Primero se realizó una prueba de normalidad de los datos de cinética de crecimiento, para la cual se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov con un (alfa) de $\alpha=0,05$. Los datos con un comportamiento normal fueron sometidos a un análisis de varianza factorial de modelo lineal general Univariante, se analizó empleando una prueba de Tukey. Para la cinética de crecimiento el modelos fue de 3 x 7 (Factor Colonia con 3 niveles (E, J, K) y Factor Tiempo con 7 niveles (0, 4, 24 horas y 7, 14, 21, 28 días). Mientras, para la cinética de degradación fue de 3 x 4 (Factor Colonia con 3 niveles (E, J, K) y Factor Tiempo con 4 niveles (7, 14, 21, 28 días). Los datos que no presentaron

comportamiento normal fueron sometidos a una Prueba no paramétrica, se analizó usando la prueba de Kruskal-Wallis.

A partir de estos análisis se clasificó las colonias en subconjuntos de acuerdo a su comportamiento en los distintos periodos de tiempo, para posteriormente poder determinar si existía diferencia significativa entre las colonias seleccionadas, en cuanto a crecimiento bacteriano y a tasa de degradación.

6. CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Etapa 2: Aislamiento de bacterias e identificación morfológica

En cada una de las disoluciones sembradas de todas las muestras de suelos contaminados con hidrocarburos (suelos arcillosos y limosos) obtenidas, se evidenció UFC's, las mismas que pertenecían a un cultivo mixto. El detalle del conteo de número de colonias y cálculo de la concentración total de bacterias en unidades de UFC's / mL, se muestra en el *Anexo 3*.

Se obtuvieron 12 cultivos puros los cuales se identificaron morfológicamente mediante tinción Gram. Se denominó a cada una de las colonias puras con una referencia para posteriores ensayos. Algunas imágenes de las colonias puras se muestran en el *Anexo 4*. Mediante esta primera identificación morfológica se obtuvieron los resultados mostrados en la *Tabla 6*, en donde, 4 colonias pertenecen a la morfología Estreptobacilos, 3 colonias son de morfología Bacilos, 2 colonias de morfología Diplobacilos y una única colonia pertenece a la morfología Micrococos. Además, se estableció que un 80 % de colonias son Gram negativas y solo un 20 % son Gram positivas.

Por otro lado, hubo 2 colonias cuya morfología no pudo ser observada pues eran de consistencia viscosa lo que dificultaba su adecuado esparcimiento para la tinción Gram. Esto según bibliografía puede deberse a la estructura externa de las bacterias, específicamente la cápsula bacteriana o glicocálix. En este caso se habla de glicocálix puesto que la Colonia L y Colonia M tenían consistencia mucosa y pegajosa, lo que indica que estaban recubiertas por una capa de carácter polisacárida. El glicocálix está diseñada para proteger a la bacteria de anticuerpos, fagocitosis y cambios físico-químicos del medio (Pérez & Mota, 2012, pág. 27). Por ello, la tinción Gram se vio dificultada porque la separación de las bacterias no se logró.

Tabla 6.

Colonias puras aisladas a partir de las muestras de suelo contaminado por hidrocarburos.

Referencia Colonia	Muestra	Dilución*	Morfología	Tinción Gram
Colonia A	1	10^{-2}	Estreptobacilos	-
Colonia B	1	10^{-4}	Estreptobacilos	-
Colonia C	2	10^{-4}	Bacilos	-
Colonia D	2	10^{-4}	Bacilos	-
Colonia E	2	10^{-2}	Diplobacilos	+
Colonia F	2	10^{-6}	Estreptobacilos	-
Colonia G	2	10^{-4}	Micrococos	-
Colonia H	3	10^{-4}	Diplobacilos	-
Colonia J	3	10^{-3}	Estreptobacilos	+
Colonia K	4	10^{-3}	Bacilos	-
Colonia L	5	10^{-4}	SR	SR
Colonia M	5	10^{-3}	SR	SR

La columna Muestra y Dilución reflejan el origen de aislamiento de la bacteria. SR: Sin Referencia.

*El detalle de la Dilución se muestra en el Anexo 3.

6.2 Etapa 3: Ensayo de turbidez

Se realizaron ensayos de turbidez a lo largo de 50 días con las colonias previamente aisladas para determinar subconjuntos según las cinéticas de crecimiento en un medio de crecimiento con 10% de Gasolina Blanca.

Para determinar los subconjuntos se evaluó la normalidad de los datos revelada por la prueba de Kolmogorov-Smirnov que se detalla en la *Tabla 7*. La misma especifica que en los días 14, 21, 28, 46 y 50 los datos se comportan de forma normal (significancia mayor al valor de α), mientras al día 7 los datos no tienen un comportamiento normal.

Tabla 7.

Normalidad de los datos a partir de la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

TIEMPO		Pruebas de normalidad		
		Kolmogorov-Smirnov		
		Estadístico	Gl	Sig.
NTU's	7 días	,315	36	,000
	14 días	,107	36	,200*
	21 días	,073	36	,200*
	28 días	,081	36	,200*
	46 días	,137	36	,087
	50 días	,103	36	,200*

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

De acuerdo a la clasificación en subconjuntos de las colonias mediante la Prueba de Kruskal-Wallis, se determinó como se observa en la *Figura 16* que en el día 7 la colonia E, J y K tienen un comportamiento parecido entre ellas pero significativamente distinto del resto de las colonias, lo que indica que a partir de este periodo de tiempo las colonias mencionadas ya presentaban crecimiento bacteriano. Por ello, para los siguientes periodos de tiempo se resaltara el comportamiento de E, J y K.

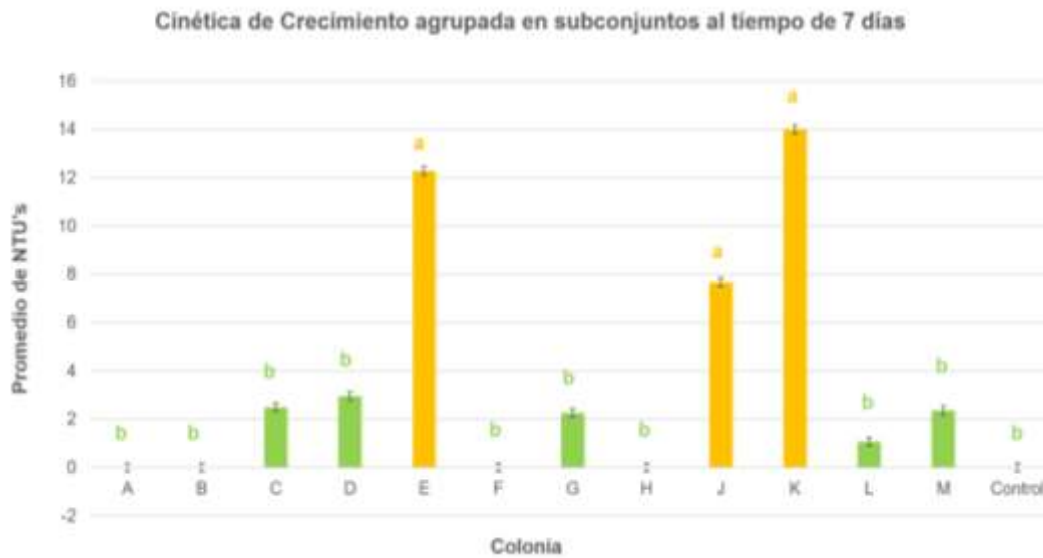


Figura 16. Cinética de Crecimiento de las colonias ensayadas representada en subconjuntos. El análisis estadístico revela dos subconjuntos al tiempo de 7 días. (a en barra mostaza = subconjunto con mayor crecimiento bacteriano) (b en barra verde = subconjunto con menor crecimiento bacteriano) y error estándar (0,18).

Mientras para los siguientes días con la Prueba de Tukey se determinó que, a los 14 días como se muestra en la *Figura 17* la colonia E, J y K se clasifican en subconjuntos diferentes, donde la colonia E y K, cada una, conforman un único subconjunto con un comportamiento de crecimiento bacteriano significativamente diferente al resto de colonias. Por otro lado, la colonia J entra en un subconjunto donde su comportamiento no presenta diferencia significativa al de las colonias A, B, C, D, G, H y M. Pero, las colonias L y F, cada una, conforman un subconjunto diferente de crecimiento bacteriano significativamente diferente al resto de colonias.

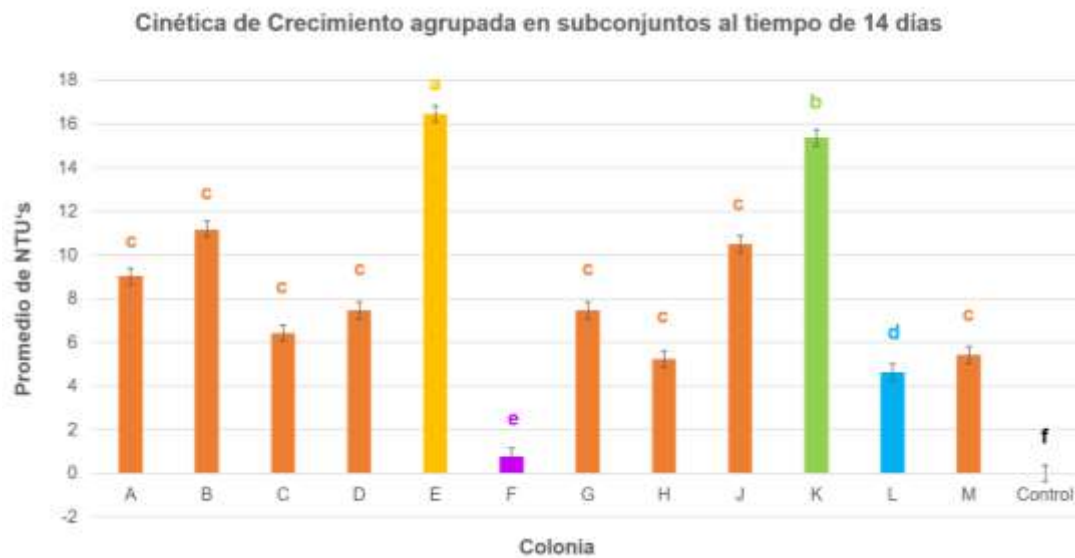


Figura 17. Cinética de Crecimiento de las colonias ensayadas representada en subconjuntos. El análisis estadístico revela cinco subconjuntos al tiempo de 14 días. (a en barra mostaza = subconjunto con mayor crecimiento bacteriano) (e en barra morada = subconjunto con menor crecimiento bacteriano) (f sin barra = sin crecimiento bacteriano) y error estándar (0,38).

Después, como se indica en la *Figura 18* a los 21 días la colonia E y K tienen un comportamiento que no presenta diferencia significativa, es decir, igual comportamiento de crecimiento bacteriano por lo que conforman el mismo subconjunto. Además, se observa que J pertenece al subconjunto donde están el resto de colonias excepto la colonia F, pues esta conforman sola un subconjunto diferente de crecimiento bacteriano significativamente diferente al resto.

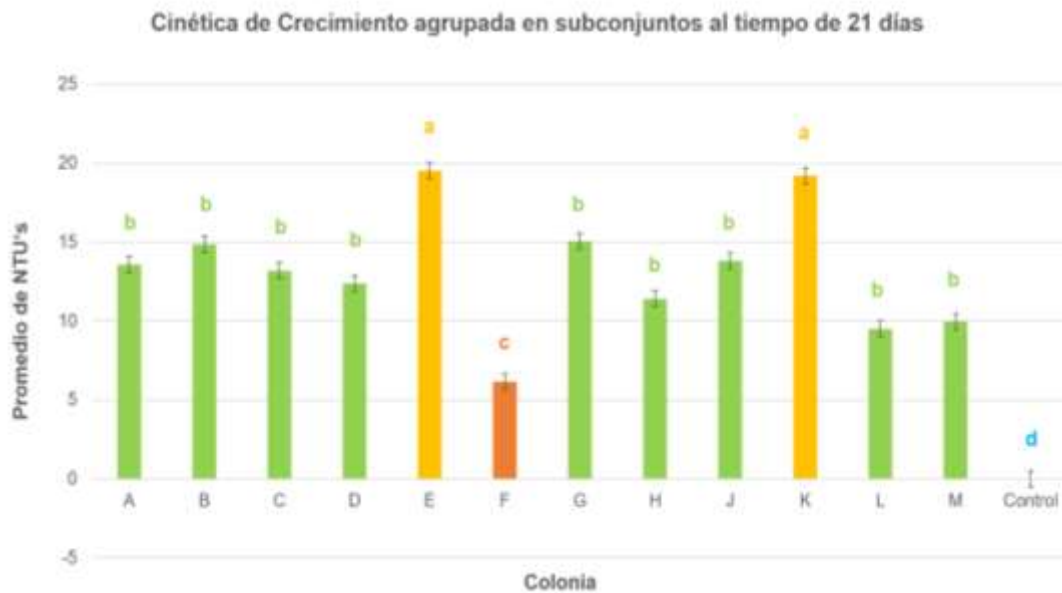


Figura 18. Cinética de Crecimiento de las colonias ensayadas representada en subconjuntos. El análisis estadístico revela cuatro subconjuntos al tiempo de 21 días. (a en barra mostaza = subconjunto con mayor crecimiento bacteriano) (c en barra roja = subconjunto con menor crecimiento bacteriano) (d sin barra = sin crecimiento bacteriano) y error estándar (0,50).

Los subconjuntos formados a los 28, 46 y 50 días se presentan en el *Anexo 5*, pues todas las colonias ensayadas conforman el mismo subconjunto, lo que indica que ninguna presenta una diferencia significativa de comportamiento que las haga diferir entre ellas.

Adicionalmente, cabe mencionar que al período de tiempo 7 días, el Control estuvo dentro del comportamiento del subconjunto b. Mientras, para el resto de días ya presento diferencia significativa con todas las colonias del ensayo. Esto debido que la muestra Control provenía de un suelo no contaminado con hidrocarburos lo que indica que la bacteria no presenta crecimiento bacteriano por motivos como los que se mencionan a continuación: el hidrocarburo es tóxico para su crecimiento, no es la fuente de carbono adecuada, no está adaptada a sobrevivir en un medio con hidrocarburo, entre otros.

Algunas imágenes del ensayo de turbidez se muestran en el *Anexo 6*.

Al realizarse un gráfico de dispersión del comportamiento de las colonias en los periodos de tiempo ensayados, como se muestra en la *Figura 19*, y corroborando con el análisis estadístico se determinó que las colonias que se debían llevar a la Etapa 5: Tasa de crecimiento bacteriano y tasa de degradación, eran la colonia E, J y K.

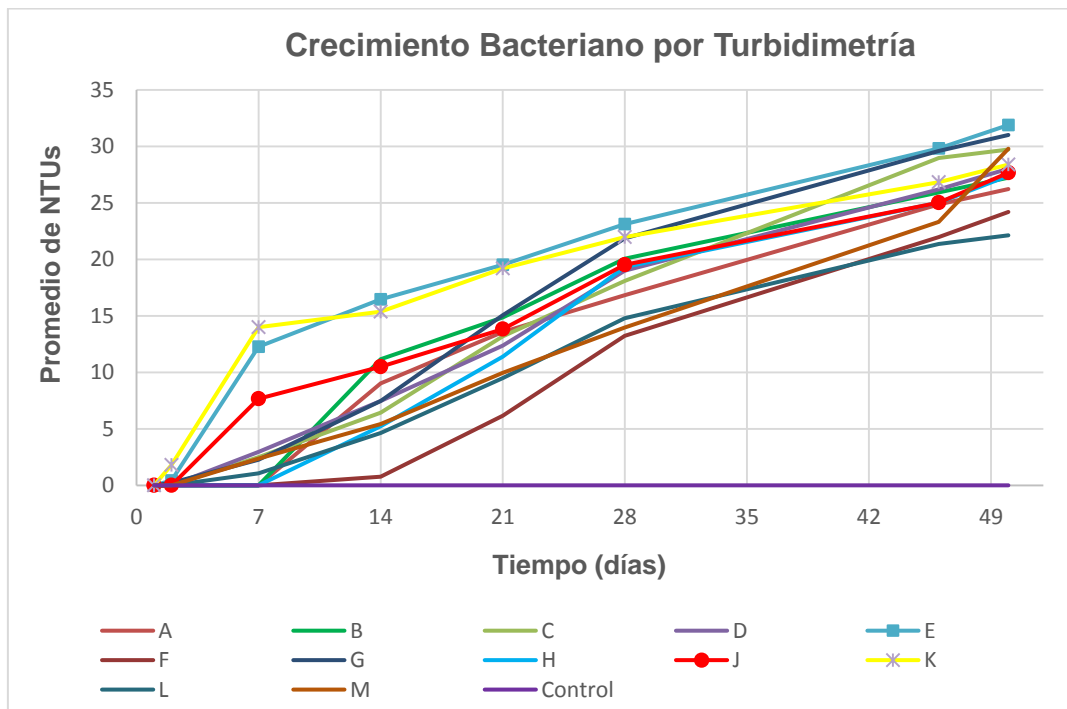





Figura 19. Comportamiento de las colonias en los periodos de tiempo ensayados. Se remarca con el siguiente diseño  la colonia E ($\bar{X} = 31,90$), con  la colonia J ($\bar{X} = 27,67$) y con  la colonia K ($\bar{X} = 28,40$). \bar{X} representa el promedio total de NTU's obtenido de los 7 periodos de tiempo ensayados.

6.3 Etapa 4: Identificación de bacterias

Previo a la Etapa 5 se identificó la colonia E, J y K a partir de pruebas bioquímicas. Para ello se empleó los cultivos puros de cada una de estas colonias, los mismos que se muestran a continuación en la *Figura 20*.

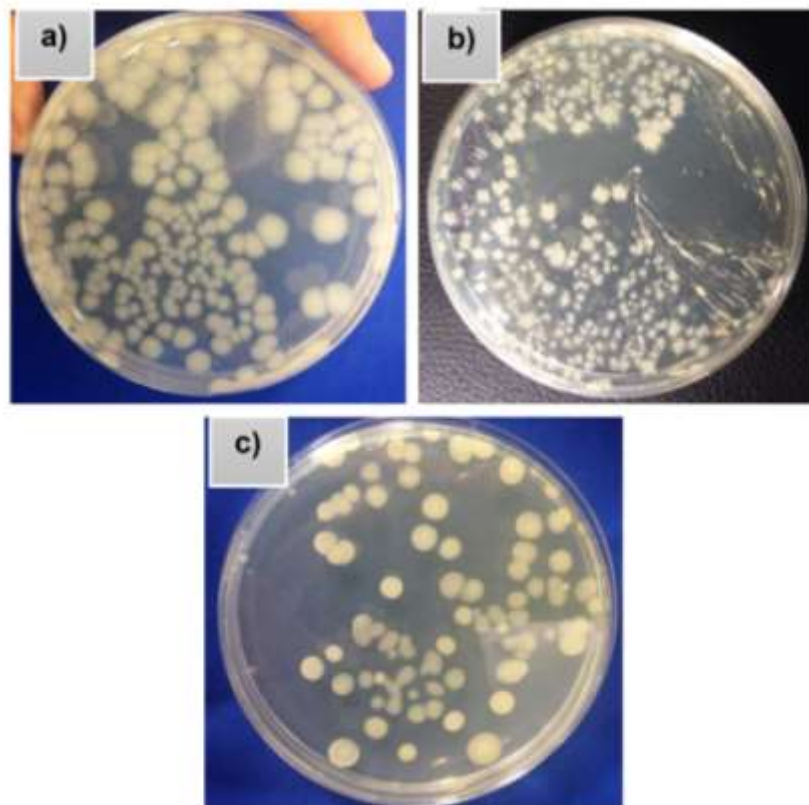


Figura 20. Cultivos bacterianos puros en agar nutritivo.

- a) Colonia E.
- b) Colonia J.
- c) Colonia K.

Una vez llevadas a cabo las pruebas bioquímicas de las colonias con mayor rendimiento de crecimiento en cada uno de los sistemas empleados (*STAF SYSTEM 18R* y *ENTEROSYSTEM 18R*), se obtuvieron los resultados detallados a continuación.

Con los datos obtenidos se procedió a realizar una compatibilidad de información empleando el software *ABIS* (de sus siglas en inglés, *Advanced Bacterial Identification Software*). Este software basado en caracteres morfo-bioquímicos, características de cultivo, condiciones de crecimiento y ecología arrojó los resultados mostrados en la *Tabla 8*.

Tabla 8.

Pruebas Bioquímicas de las colonias seleccionadas.

	PRUEBA BIOQUÍMICA	COLONIA E	COLONIA J	COLONIA K
1	McConkey	-	-	+r
2	Catalasa	-	-	+
3	Oxidasa	+	+	+
4	Descarboxilación de arginina	-	-	-
5	Hidrólisis de urea	-	-	-
6	Producción de acetoina	-	-	-
7	Reducción de nitratos	-	-	-
8	Hidrólisis de ONPG	-	-	-
9	Resistencia a novobicina	-	-	-
10	Fermentación de maltosa	+	+	+
11	Fermentación de trealosa	+	+	+
12	Fermentación de manitol	-	-	-
13	Fermentación de xilosa	-	-	-
14	Fermentación de xilitol	-	-	-
15	Fermentación de celobiosa	-	+	-
16	Fermentación de sucrosa	+	+	+
17	Fermentación de manosa	-	+	-
18	Fermentación de ribosa	+	+	-
19	Fermentación de rafinosa	-	-	-
20	Fermentación de lactosa	-	-	+
21	Fermentación de fructosa	+	+	+
22	Descarboxilación de lisina	-	-	-

23	Descarboxilación de ornitina	-	-	-
24	Descarboxilación de fenilalanina	-	-	-
25	Descarboxilación de citrato	-	-	+
26	Producción sulfuro de hidrogeno	-	-	-
27	Utilización de malonato	-	-	-
28	Prueba VP	-	-	-
29	Prueba Indol	-	-	-
30	Fermentación de glucosa	-	-	-
31	Fermentación de inositol	-	-	-
32	Fermentación de sorbitol	-	-	-
33	Fermentación de sacarosa	-	-	-
34	Fermentación de arabinosa	+	-	+
Resultado Software ABIS		<i>Bacillus smithii</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
Porcentaje de compatibilidad		86 %	85 %	87 %

r significa que las colonias eran de color rosado.

- **Identificación bacteria Colonia K**

Analizando las características de la colonia K, se obtuvo que en un 87 % de compatibilidad, se podría tratar de la bacteria *Pseudomonas oleovorans* o también conocida como *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Este porcentaje de compatibilidad se da en las pruebas bioquímicas número 3, 5, 12, 21, 22, 23, 26, 29 en donde estas coinciden con los resultados expuestos en la *Tabla 8* (ABIS Encyclopedia, 2016). Además, mediante la prueba de crecimiento en Agar McConkey también se demuestra que coincide con referencia

bibliográfica. Pues *Pseudomonas oleovorans* crece en este medio de cultivo y forma colonias de color rosado, lo que indica que se trata de una bacteria Gram negativa y fermentadora de lactosa (Becton Dichinson, 2014, págs. 1-3). Donde se corrobora la prueba bioquímica número 20 y además cumple con la morfología especificada para la bacteria mediante tinción Gram mostrada en la *Tabla 6*.

Adicionalmente, se corroboraron estos resultados con otra fuente bibliografía, el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (de su traducción del título original del manual en inglés, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*). Este es el recurso principal más conocido y empleado para determinar la identidad de los organismos procariotas, destacando las especies bacterianas, usando cada aspecto que las caracteriza. En el manual el género de bacterias *Pseudomonas* está descrito como bacterias Gram negativas, por lo general ocurren en forma simple o en parejas pero no se descarta la forma en cadena, aeróbicas estrictas donde su metabolismo respiratorio depende el oxígeno o en ciertos casos el nitrato, son catalasa positiva, pueden crecer en medios mínimos, la temperatura de crecimiento oscila entre los 28° C y los 45 °C y el pH de crecimiento no debe estar bajo el valor de 4,5 (Brenner, Krieg, & Staley, págs. 323-329). Esta información coincide con lo realizado durante el ensayo de degradación, pues fue un sistema aeróbico llevado a 37° C y con un pH que oscilaba entre 6 – 8 unidades de pH, además se emplearon medios mínimos y soluciones salinas mínimas. También coincide en características de morfología como se señaló en la *Tabla 6*, diplobacilos, es decir que ocurren en forma de parejas, la tinción Gram y morfología se muestran en el *Anexo 7*.

A esto se suma, las características ecológicas de la bacteria en cuestión. En donde, el género *Pseudomonas* es notorio debido a su capacidad y alta contribución en la degradación hidrocarburos y sus derivados. Por ello, se suelen aislar e identificar en sitios contaminados con este tipo de compuestos (Obayori, y otros, 2009, pág. 243). En definitiva, entonces corroboramos la posibilidad de que la Colonia K sea la bacteria *Pseudomonas oleovorans*, pues

el aislamiento de los microorganismos se realizó de suelos contaminados con hidrocarburos y la Colonia K fue una de las bacterias seleccionadas para el ensayo de degradación por su capacidad de degradar hidrocarburos (factor vinculado a la tasa de crecimiento) en el ensayo de turbidez, cuyos resultados se mencionan y discuten más adelante.

Finalmente, cabe mencionar que el 13 % que no es compatible con la bacteria mencionada podría deberse a que no todas las pruebas de fermentación de azúcares son compatibles (p. ej. prueba número 30 es negativa en el Manual de Bergey, mientras en este proyecto la prueba arrojó resultado positivo). Además, existen varias pruebas nutricionales características que durante este ensayo no se llevaron a cabo (Brenner, Krieg, & Staley, pág. 359 y 360).

- **Identificación bacteria Colonia J**

Mientras, al analizar la información de la colonia J, se obtuvo una relación del 85 % de compatibilidad, donde se podría tratar de la bacteria *Lysinibacillus sphaericus* o también conocida como *Bacillus sphaericus*. Este porcentaje de compatibilidad se da en las pruebas bioquímicas número 3, 4, 5, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 22, 23, 26, 29, 31, 32 y 33 en donde estas coinciden con los resultados expuestos en la *Tabla 8* (ABIS Encyclopedia, 2016). Además, mediante la prueba de crecimiento en Agar McConkey también se demuestra que coincide con referencia bibliográfica. Pues el medio McConkey posee sales biliares y cristal violeta, dos componentes que inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas, lo que indica que la bacteria de la colonia J se trata de una bacteria Gram positiva (Becton Dickinson, 2014, págs. 1-3). Donde se cumple con la morfología especificada para la bacteria mediante tinción Gram mostrada en la *Tabla 6*, la tinción Gram y morfología se muestran en el *Anexo 7*.

Adicionalmente, se corroboraron estos resultados con la fuente bibliografía antes mencionada, Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey. El género de bacterias *Bacillus*, se ha descrito como Gram positivos o Gram negativos

que ocurren en forma sola, en parejas, en cadenas y a veces en filamentos muy largos, su metabolismo respiratorio es aerobio pero también anaerobio facultativo o estricto, varias especies crecen en medios mínimos, catalasa positivos o negativos (Brenner, Krieg, & Staley, págs. 21-31). Por otro lado, se establece que sobreviven a temperaturas bajas entre 10° C y máximas alrededor de los 40° C, y soportan pH ácido (Calvo & Zúñiga, 2010, pág. 31). Esta información coincide con los parámetros empleados durante el ensayo de degradación (Ver información en la sección de Identificación bacteria Colonia K). También coincide en características de morfología como se señaló en la *Tabla 6*, estreptobacilos, es decir que ocurren en forma de cadena.

A esto se suma, las características ecológicas de la bacteria en cuestión. Para el año 2004, Ghazali et al. determinaron que el género de bacterias *Bacillus* tenía una estrecha relación e importancia en procesos de degradación de petróleo y sus derivados. Por ello, este género suele ser uno de los más abundantemente encontrados en sitios contaminados por hidrocarburos (Acuña, Pucci, & Pucci, 2010, pág. 131). Además, este género se caracteriza por aislarse e identificarse en varios tipos de hábitats (suelos, aguas dulces y aguas saladas), en donde específicamente *Bacillus sphaericus* se encuentra mayormente en sitios bioremediados por técnicas de compostaje (Brenner, Krieg, & Staley, pág. 48). En definitiva, entonces corroboramos la posibilidad de que la Colonia J sea la bacteria *Bacillus sphaericus*, pues el aislamiento de los microorganismos se realizó de suelos contaminados con hidrocarburos y la Colonia J fue una de las bacterias seleccionadas para el ensayo de degradación precisamente por su capacidad de degradación de derivados de petróleo (factor vinculado a la tasa de crecimiento) en el ensayo de turbidez, cuyos resultados se mencionan y discuten más adelante.

Finalmente, es necesario mencionar que el 15 % que no es compatible con la bacteria mencionada podría deberse a que no todas las pruebas de fermentación de azúcares son compatibles (p. ej. prueba número 16 y 25 son positivas en el Manual de Bergey, mientras en este proyecto la prueba dio

resultado negativo). Además, existen varias pruebas características que durante este ensayo no se llevaron a cabo (Brenner, Krieg, & Staley, págs. 77, 87 y 88).

- **Identificación bacteria Colonia E**

Por otro lado, se analizó la colonia E, y se determinó en un 86 % de compatibilidad que se trata de la bacteria *Bacillus smithii*. Este porcentaje de compatibilidad se da en las pruebas bioquímicas número 3, 4, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 15, 19, 20, 22, 23, 24, 26, 28, 29, 31 y 33 en donde estas coinciden con los resultados expuestos en la *Tabla 8* (ABIS Encyclopedia, 2016). Además, mediante la prueba de crecimiento en Agar McConkey también se demuestra que coincide con referencia bibliográfica. Pues el medio McConkey posee sales biliares y cristal violeta, dos componentes que inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas, lo que indica que la bacteria de la colonia E se trata de una bacteria Gram positiva (Becton Dickinson, 2014, págs. 1-3). Donde se confirma la morfología especificada para la bacteria mediante tinción Gram mostrada en la *Tabla 6*.

Adicionalmente, se corroboraron estos resultados con la fuente bibliografía antes mencionada, Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Ver información sobre el género *Bacillus* en la sección de Identificación bacteria Colonia J). Además, específicamente *Bacillus smithii* ha sido determinada como una bacteria aeróbica pero anaerobia facultativa, crece a temperaturas entre 25 – 65° C, y su pH está entre 5.5 – 7 unidades (Bosma, y otros, 2016, pág. 1 y 2). Esta información coincide con los parámetros empleados durante el ensayo de degradación (Ver información en la sección de Identificación bacteria Colonia K). También coincide en características de morfología como se señaló en la *Tabla 6*, diplobacilos, es decir que ocurren en forma de pares, la tinción Gram y morfología se muestran en el *Anexo 7*.

A esto se suma, las características ecológicas de la bacteria en cuestión. *Bacillus smithii* ha sido aislada e identificada no solo en alimentos como se menciona en cierto bibliografía, sino también se ha encontrado en pilas de compostaje y suelos cálidos, en donde su amplio rango de estabilidad a diferentes temperaturas y pH, además de utilizar varias fuentes de carbono la hacen una bacteria interesante para las aplicaciones biotecnológicas (Bosma, y otros, 2016, pág. 2). Adicionalmente, Se ha asilado e identificado esta bacteria en estudios de degradación de hidrocarburos (Arafa, 2003, pág. 1482) y metales pesados (Shakya, Pradhan, Shrestha, & Tuladhar, 2011, pág. 1).

En definitiva, entonces reconocemos la posibilidad de que la Colonia E sea la bacteria *Bacillus smithii*, pues el aislamiento de los microorganismos se realizó de suelos contaminados con hidrocarburos y la Colonia E fue una de las bacterias seleccionadas para el ensayo de degradación precisamente por su capacidad de degradación de derivados de petróleo (factor vinculado a la tasa de crecimiento) en el ensayo de turbidez, cuyos resultados se mencionan y discuten más adelante.

6.4 Etapa 5: Tasa de crecimiento bacteriano y Tasa de degradación

- **Tasa de crecimiento bacteriano**

Posterior a la siembra en agar nutritivo (Medio deshidratado, CULTIMED) y a partir del conteo en placa de las UFC's ⁽³⁾ a los diferentes periodos de tiempo, se obtuvo el comportamiento que me muestra en la *Figura 21*, *Figura 22* y *Figura 23*. En donde, se realizó las curvas de crecimiento bacteriano, las mismas que mostraron el proceder de las bacterias en fase latente, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (excluyendo esta última fase en la Cinética de Crecimiento Colonia J).

³ Las tablas que muestran el cálculo de UFC's/mL a partir del conteo en placa se muestran en el *Anexo 8*.

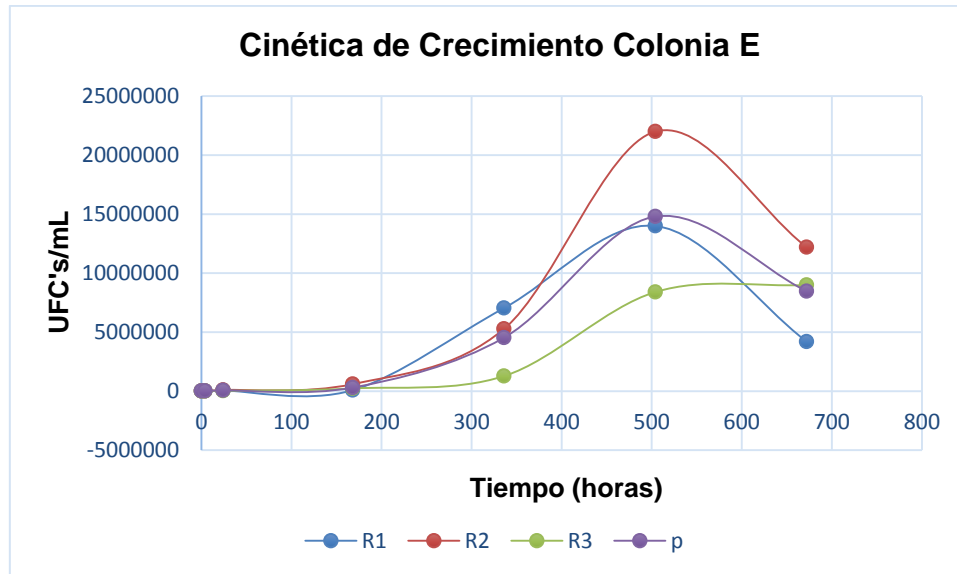


Figura 21. Cinética de Crecimiento bacteriano durante 28 días del ensayo.

Las etiquetas marcadas como R (R1, R2 y R3) hacen referencia a las 3 repeticiones que se realizó con la Colonia E, y la etiqueta P hace referencia a un promedio entre las tres repeticiones.

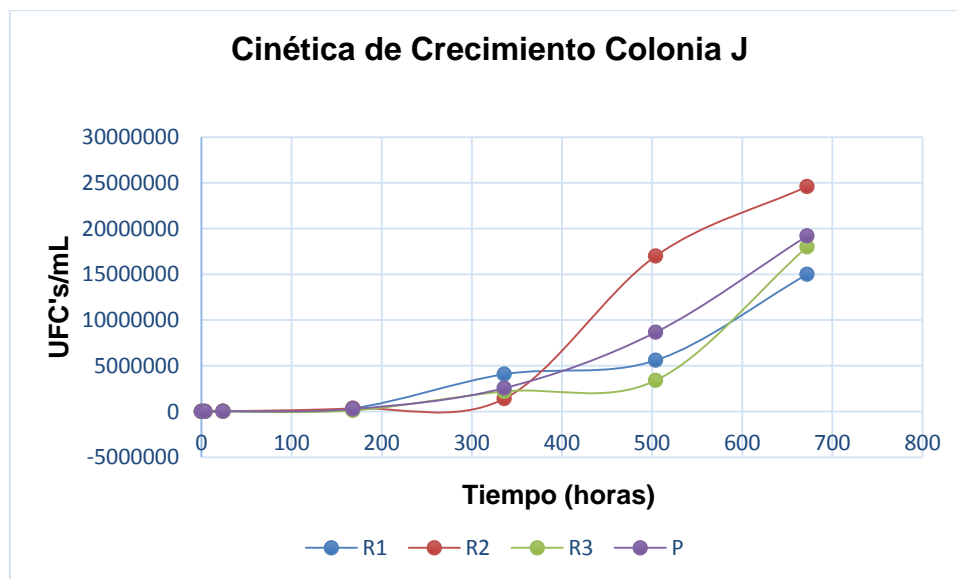


Figura 22. Cinética de Crecimiento bacteriano durante 28 días del ensayo.

Las etiquetas marcadas como R (R1, R2 y R3) hacen referencia a las 3 repeticiones que se realizó con la Colonia J, y la etiqueta P hace referencia a un promedio entre las tres repeticiones.

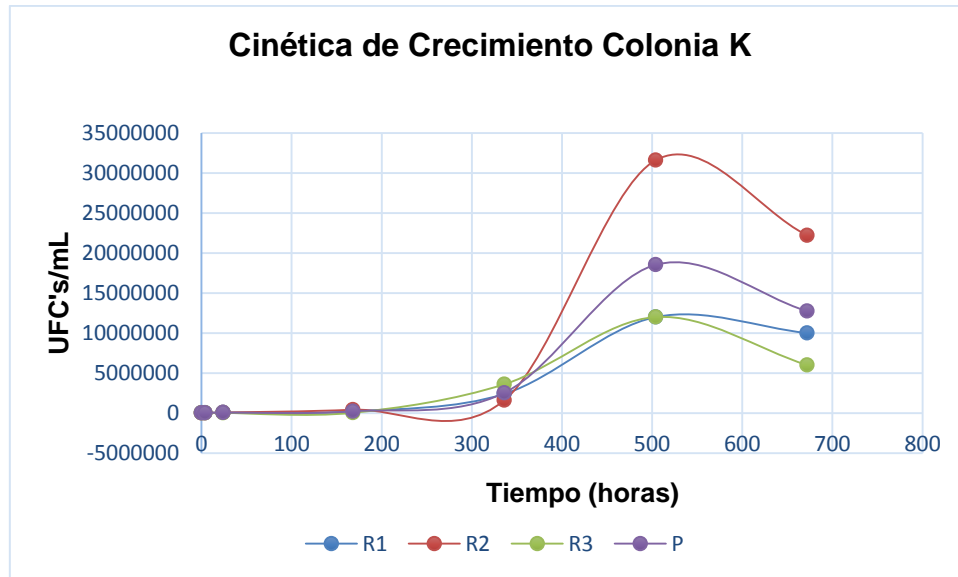


Figura 23. Cinética de Crecimiento bacteriano durante 28 días del ensayo.

Las etiquetas marcadas como R (R1, R2 y R3) hacen referencia a las 3 repeticiones que se realizó con la Colonia K, y la etiqueta P hace referencia a un promedio entre las tres repeticiones.

Por otro lado, a partir de los datos obtenidos se realizó la prueba de normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. El resultado se establece en la *Tabla 9*. La prueba determina que los datos de los periodos de tiempo 0, 4 horas y 7, 14, 21, 28 días se comportan de manera normal (significancia mayor al valor de α), mientras el periodo de tiempo 24 horas no tiene datos con un comportamiento normal.

Tabla 9.

Normalidad de los datos a partir de la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Pruebas de normalidad				
TIEMPO		Kolmogorov-Smirnov		
		Estadístico	Gl	Sig.
UFC's	0 horas	0,178	9	,200*
	4 horas	0,174	9	,200*
	24 horas	0,288	9	0,03
	7 días	0,138	9	,200*
	14 días	0,215	9	,200*
	21 días	0,167	9	,200*
	28 días	0,172	9	,200*

* Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

Además, mediante la prueba de Tukey se determinó que las colonias E, J y K no tienen diferencia significativa en su comportamiento de crecimiento durante los periodos 0, 4 horas y 7, 14, 21, 28 días. Pero, a las 24 horas la colonia J presenta una diferencia significativa en cuanto a su crecimiento, lo que la clasifica en otro subconjunto diferente al de la colonia E y K. Cabe mencionar que durante este periodo la colonia E y K se comportan de manera similar.

Entonces, se realizó un gráfico que muestra únicamente el promedio de UFC's de las tres colonias. A partir de cuyos datos se obtuvo la tasa de crecimiento bacteriano y tiempo de duplicación. Lo mencionado se muestra en la *Figura 24* y en la *Tabla 10*.

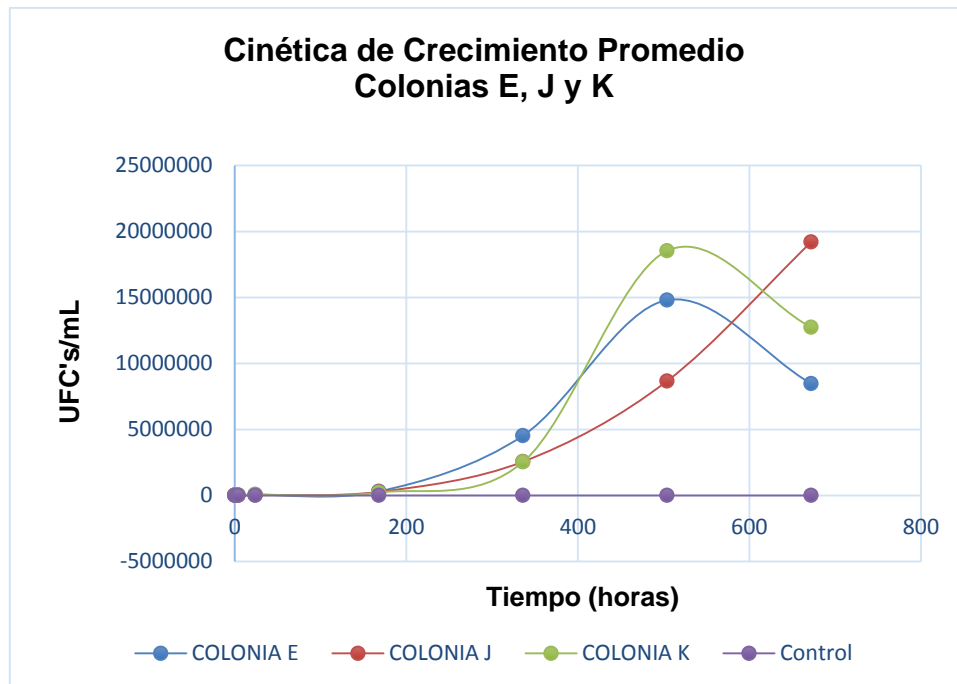


Figura 24. Cinética de Crecimiento bacteriano Promedio durante 28 días del ensayo, de la colonia E, J y K.

Colonia E ($\bar{X} = 14800000$), colonia J ($\bar{X} = 8666666$), colonia K ($\bar{X} = 18533333$) y Control (0). \bar{X} representa el promedio máximo de UFC's/mL obtenido en la fase exponencial, 21 días.

Tabla 10.

Tasa de crecimiento bacteriano y tiempo de duplicación de la Colonia E, J y K.

Referencia Colonia	μ (h^{-1})	td (h)
Colonia E	0,075	9,37
Colonia J	0,036	20,46
Colonia K	0,035	24,82

A partir de las curvas de cinética de crecimiento y la corroboración con la estadística, se concluyó que la diferencia de crecimiento entre las colonias no es significativa. A pesar de que la colonia E y K en el día 28 ya presentan la fase de muerte, la colonia J sigue en fase exponencial, esto debido a que su tiempo de duplicación es mayor que el de la colonia E, mientras su tasa de crecimiento es menor. Además, la tasa de crecimiento de las colonias E, J y K

está directamente relacionado con la tasa de degradación del hidrocarburo, parámetro que se discute más adelante.

Entonces, para entender porque en la *Figura 24* la colonia K es la que alcanza la mayor cantidad de UFC's/mL siendo la de mejor tasa de crecimiento y mayor tiempo de duplicación. Se realizó una Prueba *t* de *student* para medias de dos muestra emparejadas con un valor de (alfa) $\alpha=0,05$, con el fin de determinar si existe diferencia significativa entre colonias específicamente en los periodos de tiempo entre 14 y 21 días que es cuando las tres colonias se encuentran en fase exponencial.

De esta manera se determinó que sí existe diferencia significativa en el crecimiento bacteriano entre las tres colonias durante este período, lo que permite determinar que independientemente del tiempo de duplicación y la tasa de crecimiento expuestos en la *Tabla 10*, la Colonia K presenta la máxima concentración de UFC's/mL durante la fase exponencial. Entonces, se deduce que la Colonia K tiene mayor crecimiento que la Colonia E en un 20 % y en un 53 % que la Colonia J (durante la fase exponencial). Cabe recalcar que este fenómeno está relacionado a su favorable metabolismo de degradación de la Gasolina Blanca, parámetro que se discuten más adelante.

- **Tasa de degradación a través de emisión de CO₂**

La curva estándar que representa el comportamiento de coloración de la fenolftaleína a distintas concentraciones de hidróxido de sodio, se muestra en la *Figura 25*, donde además se indica la ecuación que describe dicha curva.

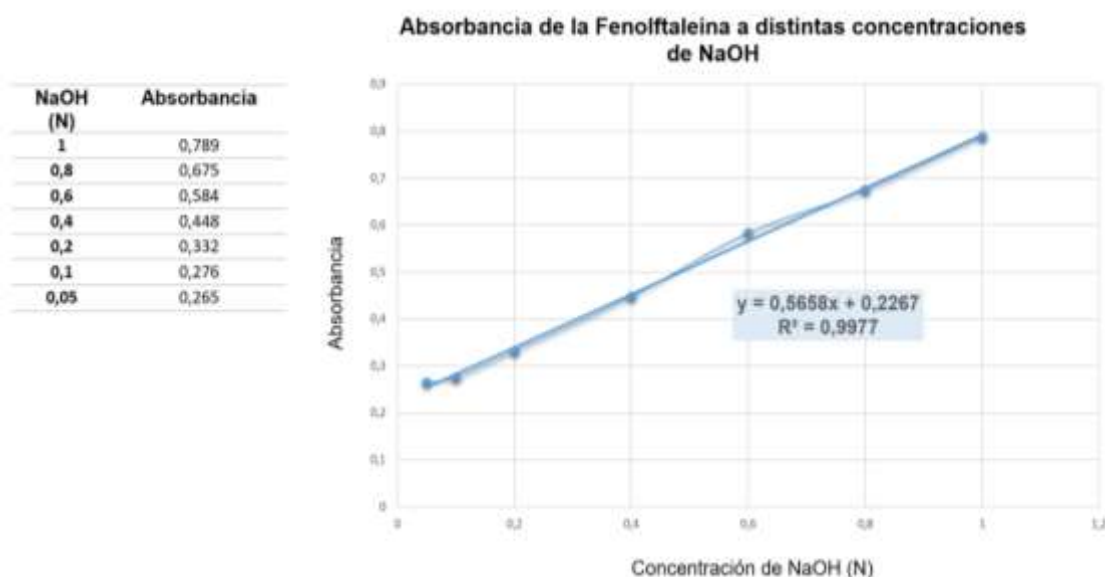


Figura 25. Curva Estándar de la absorbancia de la fenolftaleína a distintas concentraciones de NaOH.

A partir de la ecuación, los datos obtenidos de la concentración de NaOH ⁽⁴⁾ y la respectiva estequiometría se calculó la concentración de gasolina blanca remanente en cada uno de los distintos periodos de tiempo, recordando que se inició con una concentración de 261891 ppm, datos que se muestran en la *Tabla 11*. Además, en la *Figura 26*, *Figura 27* y *Figura 28* se observa gráficamente el comportamiento de las colonias respecto a la degradación de la Gasolina Blanca.

Conjuntamente, se debe mencionar que a partir de estos datos ya se observó que la colonia E y K, en la repetición 1 y repetición 3, respectivamente, ya habían degradado la totalidad del hidrocarburo, 100 %. Así mismo, se observa que para el día 28 ambas colonias en las otras repeticiones también han degradado la totalidad del hidrocarburo, 100 %. Mientras, la colonia J sólo en la repetición 2 logró degradar todo el hidrocarburo, 100%, la repetición 1 y 3 aún

⁴ Las tablas que muestran la absorbancia, concentración de NaOH, consumo de gasolina, juntos con los cálculos realizados, se muestran en el *Anexo 9*. Y además, se muestran imágenes del ensayo en el *Anexo 10*.

tienen un remanente del hidrocarburo, 6 % y 12 % de la concentración inicial de la Gasolina Blanca, respectivamente.

Tabla 11.

Concentración de la Gasolina Blanca calculada en unidades de ppm a diferentes periodos de tiempo tras el Ensayo de degradación.

Referencia Colonia	Repetición	Concentración de la Gasolina Blanca (ppm)*			
		7 días	14 días	21 días	28 días
Colonia E	1	153664,82	46676,08	0,00	0,00
	2	169998,98	95431,07	38682,25	0,00
	3	166286,67	94193,64	40909,63	0,00
	Promedio	163316,83	78766,93	26530,63	0,00
Colonia J	1	184353,24	120427,29	68133,23	16602,82
	2	172412,92	100018,30	45496,86	0,00
	3	175691,19	113745,13	70608,10	30440,92
	Promedio	177485,79	111396,90	61412,73	15681,25
Colonia K	1	181135,91	110032,82	45364,40	0,00
	2	155644,72	81819,27	33485,01	0,00
	3	156882,16	64247,68	0,00	0,00
	Promedio	164554,26	85366,59	26283,14	0,00

* Valores estimados calculados a partir de la reacción química mostrada en la página 71.

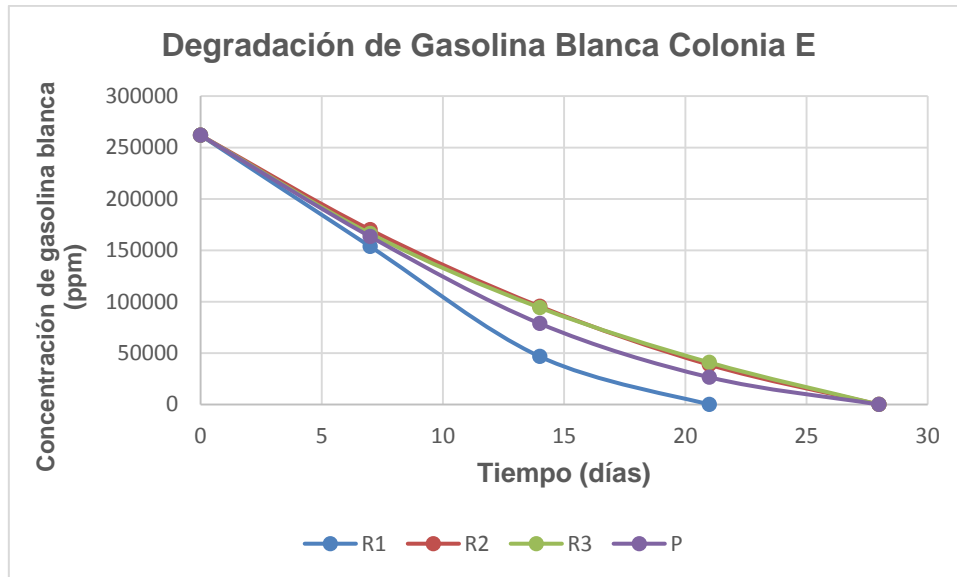


Figura 26. Cinética de degradación de Gasolina Blanca durante 28 días del ensayo.

Las etiquetas marcadas como R (R1, R2 y R3) hacen referencia a las 3 repeticiones que se realizó con la Colonia E, y la etiqueta P hace referencia a un promedio entre las tres repeticiones.

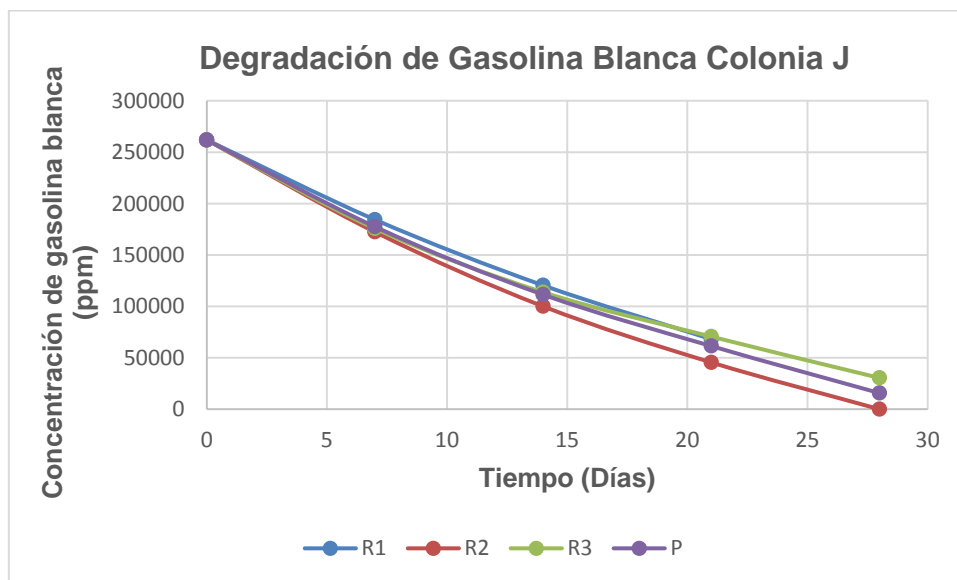


Figura 27. Cinética de degradación de Gasolina Blanca durante 28 días del ensayo.

Las etiquetas marcadas como R (R1, R2 y R3) hacen referencia a las 3 repeticiones que se realizó con la Colonia J, y la etiqueta P hace referencia a un promedio entre las tres repeticiones.

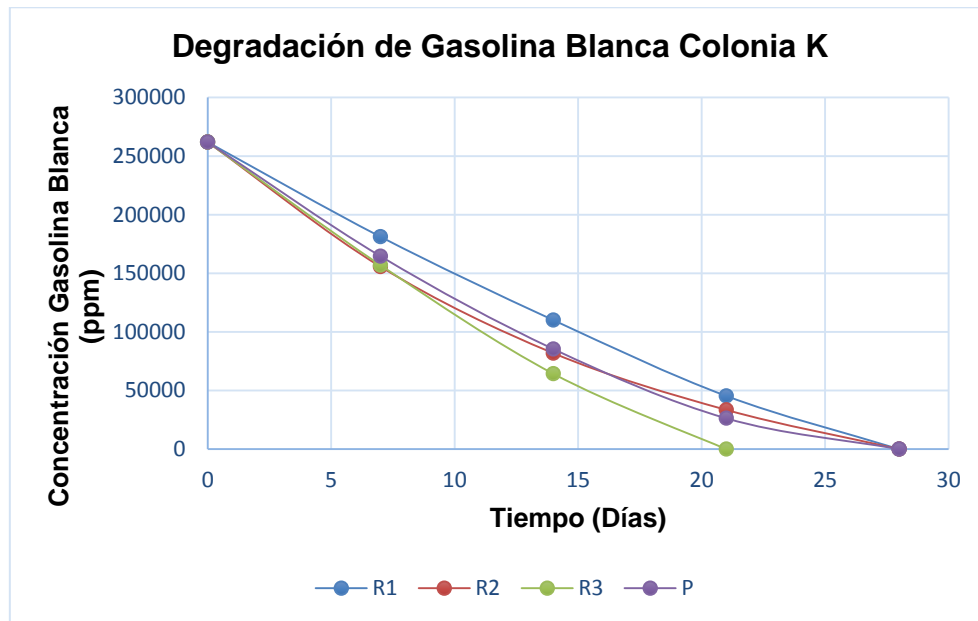


Figura 28. Cinética de degradación de Gasolina Blanca durante 28 días del ensayo.

Las etiquetas marcadas como R (R1, R2 y R3) hacen referencia a las 3 repeticiones que se realizó con la Colonia K, y la etiqueta P hace referencia a un promedio entre las tres repeticiones.

Por otro lado, a partir de los datos obtenidos se realizó la prueba de normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. El resultado se establece en la *Tabla 12*. La prueba determina que los datos de los periodos de tiempo 7, 14, 21 días se comportan de manera normal (significancia mayor al valor de α), mientras el periodo de tiempo 28 días no tiene datos con un comportamiento normal.

Tabla 12.

Normalidad de los datos a partir de la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Pruebas de normalidad				
TIEMPO		Kolmogorov-Smirnov		
		Estadístico	Gl	Sig.
ppm	7 Días	0,182	9	,200*
	14 Días	0,206	9	,200*
	21 Días	0,205	9	,200*
	28 Días	0,461	9	0

* Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

ppm es constante cuando TIEMPO = 0 Días. Se ha omitido.

Además, mediante la prueba de Tukey se determinó que las colonias E, J y K no tienen diferencia significativa entre ellas en su comportamiento de degradación durante los periodos 7, 14, 21 días. Por otro lado, para el periodo de tiempo de 28 días, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis en donde a pesar de no tener un comportamiento normal, no existe diferencia significativa entre la E, J y K. Cabe mencionar, que se observa en las curvas de degradación que la colonia E y K tienen un comportamiento de degradación similar.

Entonces, se realizó un gráfico que muestra únicamente el promedio de la degradación de la gasolina blanca de las tres colonias. A partir de cuyos datos se obtuvo la tasa de degradación del hidrocarburo y tiempo de vida media. Los mencionado se muestra en la *Figura 29* y en la *Tabla 13*.

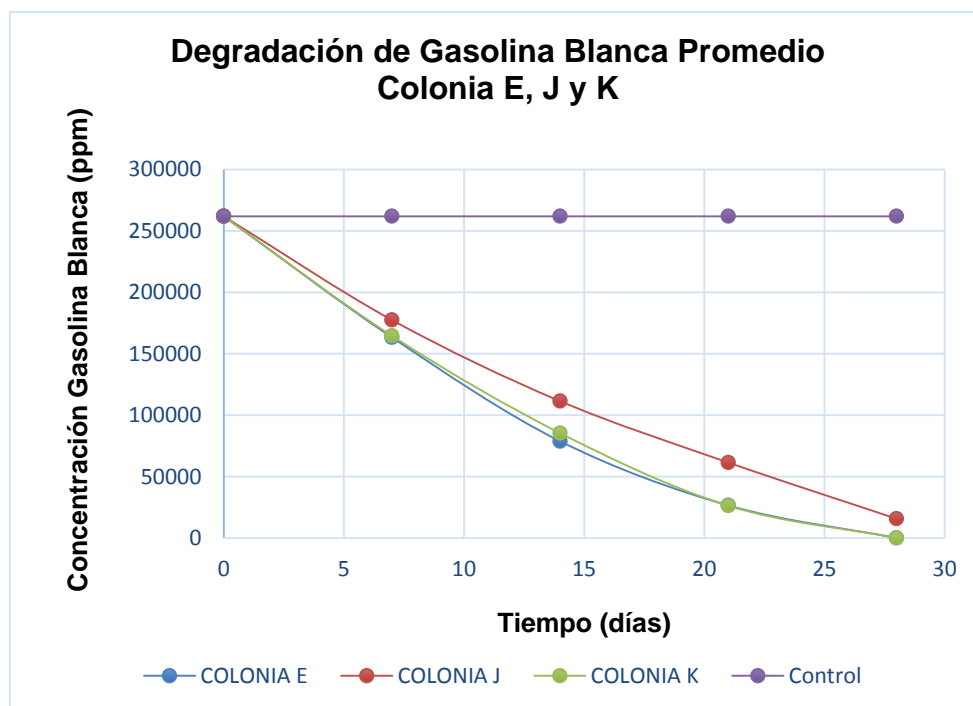


Figura 29. Cinética de Degradación Promedio durante 28 días del ensayo, de la colonia E, J y K.

Colonia E ($\overline{ppm} = 261891$)(100 %), colonia J ($\overline{ppm} = 246210$)(94 %), colonia K ($\overline{ppm} = 261891$)(100 %) y Control (0%). \overline{ppm} representa el promedio máximo de la concentración de Gasolina Blanca degradada por cada colonia a los 28 días, además se representa el porcentaje de degradación de la concentración inicial del hidrocarburo.

Tabla 13.

Tasa de degradación y tiempo de vida media del hidrocarburo correspondiente a la Colonia E, J y K.

Referencia Colonia	μ (día ⁻¹)	$t_{1/2}$ (días)
Colonia E	0,091	7, 63
Colonia J	0,090	7,71
Colonia K	0,092	7,56

A partir de las curvas de cinética de degradación y la corroboración con la estadística, se estableció que no existe diferencia de degradación significativa entre las colonias. A pesar de que la colonia E y K ya habían consumido el 100 % del hidrocarburo al día 28, la colonia J degradó en un 94 % la gasolina

blanca en ese mismo periodo. Estos resultados se corroboran con bibliografía reportada, Vinothini, Sudhakar & Ravikumar (2015) reportan en su estudio de comparación de la tasa de degradación entre bacterias degradadoras de hidrocarburos, que la cepa del género *Pseudomonas* tiene mayor tasa de degradación (98,8 %) que la cepa del género *Bacillus*. Además, establecen que el género *Pseudomonas* tiene una tasa de crecimiento mayor en un 13 % a la tasa de crecimiento del género *Bacillus*.

López de Mesa et al. (2006) menciona en su estudio que en el año 2000 se emplearon cepas del género *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter* para llevar a cabo un proceso de bioestimulación y bioaumentación que permita degradar hidrocarburos presentes en suelos costeros. Dindar, Fatma & Huseyin (2013), señalan que dentro de los microorganismos responsables y comprometidos con el proceso de degradación de hidrocarburos de petróleo, predominan las bacterias y los hongos, estando dentro de los géneros de bacterias Gram negativas las *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, entre otros, y dentro de las Gram negativas los *Bacillus*, *Micrococcus*, entre otros.

Por otro lado, se pudo estipular que tanto la colonia E, J y K requieren un promedio de 7 a 8 días para degradar el 50 % de la concentración del hidrocarburo, De esta manera, vinculando los resultados de tasa de crecimiento bacteriano y tasa de degradación, cabe mencionar que existe una correlación de estas dos variables. Como se observó en la cinética de crecimiento bacteriano, la colonia J mantuvo su cinética en fase exponencial esto debido a que aún existía Gasolina blanca en el medio. Mientras, las colonias E y K entraron en fase de muerte, pues al no existir más hidrocarburo en el medio ya no podían subsistir, pues eran dependientes de esta única fuente de carbono para sobrevivir.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Finalizado exitosamente el trabajo investigativo, se presentan las siguientes conclusiones y recomendaciones.

7.1 Conclusiones

De las muestras obtenidas de suelos contaminados con hidrocarburos (suelos arcillosos y limosos) de la Comunidad de Lumbaqui, se aislaron 12 cepas bacterianas en cultivo puro.

El ensayo de turbidez permitió aislar y obtener 3 cepas de bacterias con una alta tasa de crecimiento en medio de cultivo compuesto por solución salina nutritiva y Gasolina Blanca al 10%: *Pseudomonas oleovorans*, *Bacillus sphaericus* y *Bacillus smithii*.

La tasa de crecimiento de las bacterias *Pseudomonas oleovorans*, *Bacillus sphaericus* y *Bacillus smithii* no tiene diferencia significativa, pero cabe mencionar que en la fase exponencial de la cinética de crecimiento, *P. oleovorans* presenta el crecimiento más eficiente, con un 20 % respecto de *B.smithii* y un 53 % respecto de *B.sphaericus* al tiempo de 28 días.

Las bacterias *Pseudomonas oleovorans*, *Bacillus sphaericus* y *Bacillus smithii* tienen capacidad de degradar Gasolina Blanca, con una eficiencia del 100 % para *P.oleovorans* y *B. sphaericus*, y 94 % para *B. smithii* al tiempo de 28 días.

Las 3 cepas bacterianas aisladas en los suelos contaminados con hidrocarburos de la Comunidad de Lumbaqui son capaces de crecer en un

medio de cultivo contaminado con Gasolina Blanca al 10% y degradarlo eficientemente.

Esta investigación permitió obtener un avance en el estudio de microorganismos, específicamente bacterias, con capacidad de degradar hidrocarburos (Gasolina Blanca). Pudiendo ser empleadas en futuros estudios de biorremediación de suelos.

7.2 Recomendaciones

Llevar a cabo estudios de tolerancia y degradación con las cepas caracterizadas frente otro tipo de hidrocarburos (otras parafinas, oleofinas, acetilenos e hidrocarburos aromáticos) a diferentes concentraciones.

Realizar estudios de consorcios bacterianos entre las especies encontradas con el fin de aumentar la eficiencia de degradación y además estudiar una posible alternativa de bioaumentación *in situ*.

Desarrollar un producto basado en un consorcio microbiano que pueda ser aplicado en suelos contaminados con hidrocarburos en las zonas hidrocarburíferas de la Comunidad de Lumbaqui, como una alternativa de biorremediación.

8. REFERENCIAS

- ABIS Encyclopedia. (2016). Recuperado el 05 de Diciembre de 2016, de Pseudomonas oleovorans (P. pseudoalcaligenes): <http://www.tgw1916.net/Pseudomonas/pseudoalcaligenes.html>
- ABIS Encyclopedia. (2016). Recuperado el 05 de Diciembre de 2016, de Lysinibacillus sphaericus: <http://www.tgw1916.net/Bacillus/sphaericus.html>
- ABIS Encyclopedia. (2016). Recuperado el 05 de Diciembre de 2016, de Bacillus smithii: <http://www.tgw1916.net/Bacillus/smithii.html>
- Acción Ecológica. (2013). *Pérdida de Biodiversidad en Ecuador*. Ecuador. Recuperado el 20 de Noviembre de 2016
- Acción Ecológica. (2016). *Acción Ecológica*. Recuperado el 23 de Octubre de 2016, de Petroamazonas y su reacción ante las denuncias de contaminación en Pacayacu: <http://www.accioneologica.org/component/content/?start=80>
- Acosta, A. (1986). Transformaciones y contradicciones en el mercado petrolero. En A. Acosta, *Ecuador: petróleo, crisis y economía*. Quito: ILDIS. Recuperado el 03 de Octubre de 2016
- Acuña, A., Pucci, G., & Pucci, O. (2010). Caracterización de tres cepas bacterianas capaces de fijar nitrógeno y biodegradar hidrocarburos aisladas de un suelo de la Patagonia. *Ecosistemas*. Recuperado el 05 de Diciembre de 2016
- Acuña, A., Pucci, G., Morales, M., & Pucci, O. (2010). Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina. *RSVM*. Recuperado el 23 de Octubre de 2016
- Almeida, A. (2006). *Fases e impactos de la actividad petrolera*. Quito: Acción Ecológica. Recuperado el 29 de Mayo de 2016

- Andrades, M., & Martinez, E. (2014). *Fertilidad del suelo y parámetros que la definen*. Universidad de la Rioja. Recuperado el 18 de Octubre de 2016
- Arafa, M. (2003). Bioderadation of some aromatic hydrocarbons (BTEX's) by bacterial consortium isolated from poluuted site. *Pakistan Juornal of Biological Sciences*. Recuperado el 05 de Diciembre de 2016
- Arosemena, O. (1995). Infamia y Verdad: Historia del Petroleo Ecuatoriano y CEPE. En O. Arosemena, *Infamia y Verdad: Historia del Petroleo Ecuatoriano y CEPE*. Guayaquil: Cromos. Recuperado el 03 de Octubre de 2016
- Atkinson, J. (2000). *Soil description and classification*. London: ETH. Recuperado el 03 de Octubre de 2016
- Atlas, M., & Hazen, T. (2011). *Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in U.S. history*. Environmental Science & Technology. Recuperado el 21 de Octubre de 2016
- Atsegbua, L., & Aigbokhaevbo, V. (2014). Crude Oil Production: Its Environmental and Global Market Impact. En V. Claire, *Crude Oils: Production, Environmental Impacts and Global Market Challenges*. New York: Novinka. Recuperado el 25 de Septiembre de 2016
- Aumala, V. (2014). *GKillCity*. Recuperado el 23 de Octubre de 2016, de Baeza: tres rupturas en mes y medio: <http://gkillcity.com/articulos/el-mirador-politico/la-tierra-sangra-hace-cuatro-decadas-el-ecuador>
- Barbosa, H. (2011). *Remediación de suelo*. México: TESOEM. Recuperado el 18 de Octubre de 2016
- Becton Dichinson. (2014). *Medios en placa listos para usar: McConkey Agar*. Alemania. Recuperado el 05 de Diciembre de 2016
- Bennett, C. (1972). *La historia de los derrames de crudo empezó en Esmeraldas*. Ecuador. Recuperado el 22 de Octubre de 2016, de <http://gkillcity.com/articulos/el-mirador-politico/la-tierra-sangra-hace-cuatro-decadas-el-ecuador>

- Beristaín, C. (2009). Estudio psicosocial del impacto de las explotaciones petroleras de Texaco en las comunidades amazónicas del Ecuador. En C. Beristaín, *Las palabras de la selva*. Ecuador: Hegoa. Recuperado el 26 de Agosto de 2016
- Bertrand, J., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., & Normand, P. (2011). *Environmental Microbiology Fundamentals and Applications*. Marseille: Springer. Recuperado el 03 de Octubre de 2016
- Bhandari, A., Surampalli, R., Champagne, P., Ong, S., Tyagi, R., & Lo, I. (2007). *Remediation Technologies for soils and groundwater*. Virginia. Recuperado el 03 de Octubre de 2016
- Bosma, E., Koehorst, J., Hijum, S., Renckens, B., Vriesendorp, B., Weijer, A., . . . Kranenburg, R. (2016). Complete genome sequence of thermophilic *Bacillus smithii*. *Genomic Sciences*. Recuperado el 05 de Diciembre de 2016
- Bravo, E. (2007). *Los impactos de la explotación petrolera en ecosistemas tropicales y la biodiversidad*. Recuperado el 20 de Noviembre de 2016
- Brennan, D. (2010). *World Socialist Web Site*. Recuperado el 20 de Noviembre de 2016, de The oil spill and the food chain: <https://www.wsws.org/en/articles/2010/06/oils-j30.html>
- Brenner, D., Krieg, N., & Staley, J. (s.f.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. USA: Springer. Recuperado el 05 de Diciembre de 2016
- Buller, N. (2014). *Bacteria, Fungi, Fish And Other Aquatic Animals*. London: Cabi. Recuperado el 02 de Octubre de 2016
- Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF *Bacillus* spp. STRAINS FROM POTATO *Solanum tuberosum* RHIZOSPHERE. *Ecología Aplicada*. Recuperado el 05 de Diciembre de 2016

- Casas, V. (2014). *Derrames de hidrocarburos al mar: Un acercamiento a los riesgos, impactos y medidas de seguridad*. Recuperado el 20 de Noviembre de 2016
- Castillo, F. (2005). *Biología Ambiental*. España: Tebar. Recuperado el 19 de Octubre de 2016
- Cely, N. (2013). *The World Post*. Recuperado el 29 de Mayo de 2016, de Environmental Justice Knows No Borders: http://www.huffingtonpost.com/nathalie-cely/environmental-justice-knows_b_3725766.html
- Cetmar. (2012). *Cetmar*. Recuperado el 20 de Noviembre de 2016, de ¿Evolución y comportamiento de las manchas de petróleo?: <http://www.cetmar.org/documentacion/comportamiento.htm>
- Chang, B., Chang, I., & Yuan, S. (2008). Anaerobic degradation of phenanthrene and pyrene in mangrove sediment. *Springer*, 145. Recuperado el 03 de Octubre de 2016
- Cleland, E. (2011). *Biodiversity and Ecosystem Stability*. San Diego: Nature Education Knowledge. Recuperado el 18 de Octubre de 2016
- Cuvi, N., & Bejarano, M. (2015). Los halos de inhibición en la remediación de suelos amazónicos contaminados con petróleo. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*. Recuperado el 23 de Octubre de 2016
- Dadrasnia, A., Salmah, I., Emenike, C., & Shamsavari, N. (2014). Remediation of oil contaminated media using organic material supplementation. *Petroleum Science and Technology*. Recuperado el 25 de Septiembre de 2016
- De Dardel, F. (2015). *De Dardel Info*. Recuperado el 18 de Octubre de 2016, de Ion exchange capacity: <http://dardel.info/IX/capacity.html>
- Dindar, E., Fatma, T., & Huseyin, S. (2013). Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soil. *Journal Biology Environmental Science*. Recuperado el 05 de Diciembre de 2016

- Ecuambiente Consulting Group. (2010). *Centro Integral de Ingeniería Ecológica del Ecuador*. Recuperado el 29 de Mayo de 2016, de Derrames, Desechos y Manejo de remediación: http://www.ecuambiente.com/index.php?option=com_content&view=article&id=119&Itemid=241
- EP PETROECUADOR. (2016). *Empresa Pública de Hidrocarburos del Ecuador*. Recuperado el 03 de Octubre de 2016, de Oleoducto TransEcuatoriano cuarenta y tres años transportando la economía del país: <http://www.eppetroecuador.ec/?p=2683>
- EPA. (2006). *In Situ and Ex Situ Biodegradation Technologies for Remediation of Contaminated Sites*. Cincinnati. Recuperado el 04 de Octubre de 2016
- EPA. (2014). *Best Practice Note: Landfarming*. Sydney. Recuperado el 04 de Octubre de 2016
- FAO. (2013). *Permeabilidad del suelo*. Recuperado el 18 de Octubre de 2016, de ftp://ftp.fao.org/fi/CDrom/FAO_training/FAO_training/general/x6706s/x6706s09.htm
- FAO. (2015). *Suelos y Biodiversidad*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Italia. Recuperado el 02 de 10 de 2016
- Fenton, M., Albers, C., & Katterings, Q. (2008). *Soil Organic Matter*. Cornell University Cooperative Extension: Department of Crop and Soil Sciences. Recuperado el 03 de Octubre de 2016
- Fodelianakis, S., Antoniou, E., Mapelli, F., Maganini, M., Nikopoulou, M., Marasco, R., . . . Abedl-Fattah, Y. (2015). Allochthonous bioaugmentation in ex situ treatment of crude oil-polluted sediments in the presence of an effective degrading indigenous microbiome. *Elsevier*. Recuperado el 25 de Septiembre de 2016

- Foley, N. (2016). *Environmental Characteristics of Clays and Clay Mineral Deposits*. London: Academic Press. Recuperado el 18 de Octubre de 2016
- Fontaine, G. (2004). *Petróleo y desarrollo sostenible en Ecuador*. Quito: FLACSO. Recuperado el 03 de Octubre de 2016
- García, N., & Aguirre, M. (2014). Biodegradación de petróleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México. Recuperado el 22 de Octubre de 2016
- Gobierno, C. S. (1978). *Ley de Hidrocarburos*. Ecuador. Recuperado el 03 de Octubre de 2016
- Gómez, R., Gutierrez, D., Hernandez, A., Hernandez, C., Losada, M., & Mantilla, P. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *NOVA*. Recuperado el 18 de Octubre de 2016
- Gouda, M., Omar, S., Nour, H., & Checkroud, Z. (2009). Bioremediation of kerosene II: a case study in contaminated clay. *Elsevier*, 1451-1453. Recuperado el 26 de Agosto de 2016
- GreenPeace. (Enero de 2012). *GreenPeace Organisation*. Recuperado el 29 de Mayo de 2016, de Impactos Ambientales del Petróleo: http://www.greenpeace.org/mexico/global/mexico/report/2012/1/impactos_ambientales_petroleo.pdf
- Guerra, E. (1998). *El Ecuador y el petróleo, siglo XX de la Industria Hidrocarbúrfera*. Quito: PetroEcuador. Recuperado el 03 de Octubre de 2016
- Havlicek, E., & Mitchell, A. (2014). Soils Supporting Biodiversity. En J. Dighton, & J. Adams, *Interactions in soil: Biodiversity, Community and Ecosystems* (págs. 27-29). New York: Springer. Recuperado el 25 de Septiembre de 2016

- Hooda, V. (2007). Phytoremediation of toxic metals from soil and waste water. *Journal of Environmental Biology*. Recuperado el 04 de Octubre de 2016
- Howe-Grant, M. (1996). *Petroleum*. New York. Recuperado el 25 de Septiembre de 2016
- ITOPF. (2012). *Destino de los derrames de hidrocarburos en el medio marino*. London. Recuperado el 20 de Noviembre de 2016
- Iturbe, R., & López, J. (2015). Bioremediation for a Soil Contaminated with Hydrocarbons. *Petroleum & Environmental Biotechnology*. Recuperado el 25 de Septiembre de 2016
- Jarrín, S., Espín, W., & Mancheno, S. (2013). *Marco Legal de la minería y estado de los oleoductos en Ecuador*. Recuperado el 29 de Mayo de 2016, http://www.grupofaro.org/sites/default/files/archivos/publicaciones/2013/2013-11-13/marco_legal_de_la_mineria_y_estado_de_los_oleoductos_en_ecuador.pdf
- Jonge, L. (2009). Interactive comment on “Soil Infrastructure, Interfaces and Translocation Processes in Inner Space (Soil-it-is): towards a road map for the constraints and crossroads of soil architecture and biophysical processes. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions*. Recuperado el 23 de Octubre de 2016
- Jorgensen, K., Puustinen, J., & Suortti, A. (2012). Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Elsevier*. Recuperado el 04 de Octubre de 2016
- Ketterings, Q., Reid, S., & Rao, R. (2007). *Cation exchange capacity*. New York: Cornell University Cooperative Extension. Recuperado el 18 de Octubre de 2016
- Kimerling, J. (1993). *Crudo Amazónico*. Quito: Abya-Yala. Recuperado el 03 de Octubre de 2016

- Lake, B. (2012). *Understanfing of soil pH*. NSW. Recuperado el 18 de Octubre de 2016
- Larrea, C. (2012). *Yasuní-ITT: Una iniciativa para cambiar la Historia*. Ecuador. Recuperado el 03 de Octubre de 2016
- Léveque, C., Balian, E., & Martens, K. (2005). An assessment of animal species diversity in continental waters. En H. Segers, & K. Martens, *The Diversity of Aquatic Ecosystems* (págs. 58-62). Holanda: Springer. Recuperado el 02 de Octubre de 2016
- Liang, Y., Zhang, X., Dai, D., & Li, G. (2009). Porous biocarrier-enhanced biodegradation of crude oil contaminated soil. *Elsevier*, 80-81. Recuperado el 26 de Agosto de 2016, de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830508001212>
- Llató, S. (2012). *Biorremediación de suelos contamiandos por hidrocarburos pesados caracterización de comunidades microbiana implicadas*. Recuperado el 29 de Mayo de 2016, de Universidad de Barcelona: <http://www.tdx.cat/handle/10803/98247>
- Long, R., & Speight, J. (1998). *The Compositium of Petroleum*. Washington: Taylor & Francis Group. Recuperado el 25 de Septiembre de 2016
- López de la Mesa, J., Quintero, G., Guevara, L., Jaimes, D., Gutierrez, S., & Miranda, J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA*. Recuperado el 05 de Diciembre de 2016
- López, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutierrez, S., & Miranda, J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA*. Recuperado el 18 de Octubre de 2016
- Lu, X., Xhang, T., & Fang, H. (2011). Bacteria-mediated PAH degradaton in soil and sediment. *Springer*. Recuperado el 03 de Octubre de 2016

- Madanhire, I., & Mbohwa, C. (2016). *Mitigating Environmental Impact of Petroleum*. South Africa: Springer. Recuperado el 12 de Noviembre de 2016
- Malinverno, A. (2008). *Introduction to Physical Properties*. Spring. Recuperado el 18 de Octubre de 2016
- Manchola, L., & Dussán, J. (2014). Lysinibacillus sphaericus and Geobacillus sp Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons and Biosurfactant Production. *Winter*. Recuperado el 20 de Octubre de 2016
- Maroto, M., & Rogel, J. (2015). APLICACIÓN DE SISTEMAS DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS Y AGUAS CONTAMINADAS POR HIDROCARBUROS. *GEOCISA*. Recuperado el 18 de Octubre de 2015
- Martz, J. (1897). *Politics and Petroleum in Ecuador*. New Jersey: Transaction. Recuperado el 03 de Octubre de 2016
- MCA-UGT Federación de Industria. (2010). *Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) Acercamiento a su problemática como riesgo laboral*. Recuperado el 29 de Mayo de 2016, de http://portal.ugt.org/saludlaboral/publicaciones_new/files_hidrocarburos/binder1.pdf
- McCauley, M., Jones, C., & Jacobsen, J. (2005). *Basic soil properties*. Montana. Recuperado el 10 de Octubre de 2016
- Merry, R. (2013). Acidity and Alkalinity of soils. En R. Merry, *Environmental And Ecological Chemistry*. Australia: EOLLS. Recuperado el 19 de Octubre de 2016
- Ministerio de Hidrocarburos. (2016). *Normativa completa del sector petrolero del Ecuador*. Ecuador. Recuperado el 03 de Octubre de 2016
- Ministerio del Ambiente. (1973). *17 fugas de petróleo en el segundo año de extracción*. Ecuador. Recuperado el 23 de Octubre de 2016, de <http://gkillcity.com/articulos/el-mirador-politico/la-tierra-sangra-hace-cuatro-decadas-el-ecuador>

- Ministerio del Ambiente. (2015). *Programa de Reparación Ambiental y Social (PRAS)*. Quito. Recuperado el 28 de Octubre de 2016
- Mulligan, C. (2005). *Environmental Applications for Biosurfactants*. Elsevier. Recuperado el 03 de Octubre de 2016
- Nilanjana, D., & Preethy, C. (2010). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, 1-2. Recuperado el 29 de Mayo de 2016
- Nimmo, J. (2004). Aggregation: Physical Aspects. En J. Nimmo, *Encyclopedia of Soils in the Environment* (págs. 1-3). London: Academis Press. Recuperado el 15 de Octubre de 2016
- Nimmo, J. (2004). Porosity and Pore Size Distribution. En J. Nimmo, *Encyclopedia of Soils in the Environment* (págs. 295-296). London: Elsevier. Recuperado el 18 de Octubre de 2016
- Noboa Bejarano, G. (2001). *Decreto Ejecutivo 1215*. Ecuador. Recuperado el 03 de Octubre de 2016
- Obayori, O., Adebusoye, A., Adewale, O., Oyetibo, G., Oluyemi, O., Amokun, R., & Illori, M. (2009). Differential degradation of crude oil (Bonny light) by four *Pseudomonas* strains. *Science Direct*. Recuperado el 05 de Diciembre de 2016
- Ochoa, D., & Montoya, A. (2015). Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. Recuperado el 03 de Octubre de 2016
- Okafor, N. (2011). *Environmental Microbiology of Aquatic and Waste Systems*. South Carolina: Springer. Recuperado el 02 de Octubre de 2016
- Ortiz, I., Sanz, J., Dorado, M., & Villar, S. (2007). *Técnicas de recuperación de suelos contaminados*. Madrid. Recuperado el 26 de Octubre de 2016

- Ortiz, I., Sanz, J., Dorado, M., & Villar, S. (2010). *Técnicas de recuperación de suelos contaminados*. España: Elecé. Recuperado el 20 de Noviembre de 2016
- Osman, K. (2013). *Soils: Principles, Properties and Management*. London: Springer. Recuperado el 18 de Octubre de 2016
- Panagea, I., Daliakopoulos, I., Tsanis, I., & Schwilch, G. (2016). Evaluation of promising technologies for soil salinity amelioration in Timpaki (Crete): a participatory approach. *Solid Earth*. Recuperado el 18 de Octubre de 2016
- Pantoja, A. (2012). *Capítulo3: Delimitación de los Suelos*. Recuperado el 29 de Mayo de 2016, de ftp://gisweb.ciat.cgiar.org/DAPA/users/apantoja/london/Colombia/Suelos/00_shape_suelos/PROYECTO_DNP/MEMORIAS_SUELOS_OFICIALES/SANTANDER/87412%20-%203.pdf
- Paria, S. (2008). Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Elsevier*, 25-26. Recuperado el 26 de Agosto de 2016, de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868607001820>
- Pepper, I., Gerba, C., Gentry, T., & Maier, R. (2009). *Environmental Microbiology*. Elsevier. Recuperado el 25 de Noviembre de 2016
- PetroAmazonas. (2014). *Plan Estratégico 2014-2017*. Quito. Recuperado el 03 de Octubre de 2016
- Petroamazonas EP. (2016). *Petroamazonas EP*. Recuperado el 22 de Octubre de 2016, de Amazonía Viva: <http://www.petroamazonas.gob.ec/nuestros-proyectos/>
- Philips, A. (2015). *Mar de Chile*. Recuperado el 20 de Noviembre de 2016, de Hidrocarburos del petróleo: Contaminación marina: http://www.mardechile.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=370:caplo-115-hidrocarburos-del-petr&catid=47:libro-qlos-ocosq&Itemid=66

- Pírez, M., & Mota, M. (2012). Morfología y estructura bacteriana. Recuperado el 05 de Octubre de 2016
- Prieto, V., & Martínez, A. (2013). La contaminación de las aguas por hidrocarburos: un enfoque para abordar su estudio. *Cubana Hig Epidemiol.* Recuperado el 20 de Octubre de 2016
- Puga, S., Sosa, M., Lebgue, T., Quintana, C., & Campos, A. (2016). Contaminación por metales pesados en el suelo provocada por la industria minera. *Ecología Aplicada.* Recuperado el Octubre de 11 de 2016
- Reis, R., Pacheco, G., Pereira, A., & Freire, D. (2015). Biosurfactants: Production and Applications. En R. Reis, G. Pacheco, A. Pereira, & D. Freire, *Biodegradation - Life of Science.* Australia. Recuperado el 03 de Octubre de 2016
- Rodríguez, F., Roldán, M., Blasco, R., Huertas, M., Caballero, F., Moreno, V., & Luque, M. (2005). *Bioteecnología Ambiental.* Madrid: Tébar. Recuperado el 12 de Noviembre de 2016
- Rojas, A. (2014). *Tema 2. Composición del petróleo.* Recuperado el 29 de Mayo de 2016, de <http://cursoslibres.academica.mx/ingenieria-quimica/petroleo-y-petroquimica/tema-2.-composicion-del-petroleo>
- Rojo, F. (2009). 2009. *Environmental Microbiology.* Recuperado el 18 de Octubre de 2016
- Rucks, L., García, F., Kaplán, A., Ponce de León, J., & Hill, M. (2004). *Propiedades físicas del suelo.* Montevideo. Recuperado el 15 de Octubre de 2016
- Sands, G. (2011). *University of Minesota Extension.* Recuperado el 18 de Octubre de 2016, de Agricultural drainage: Soil Water concepts: <http://www.extension.umn.edu/agriculture/water/agricultural-drainage/soil-water-concepts/>

- Schmidt, W. (2012). *Suelos contaminados con hidrocarburos: La biorremediación como una solución ecológicamente compatible*. Cooperación Técnica Alemana. Recuperado el 20 de Octubre de 2016
- Science Learning. (2007). *Science Learning Hub*. Recuperado el 18 de Octubre de 2016, de Soil, Farming and Science: Soil Formation: <http://sciencelearn.org.nz/Contexts/Soil-Farming-and-Science/Science-Ideas-and-Concepts/Soil-formation>
- Shakya, S., Pradhan, B., Shrestha, J., & Tuladhar, S. (2011). Isolation and characterization of aerobic culturable arsenic-resistant bacteria from surfacewater and groundwater of Rautahat District, Nepal. *Elsevier*. Recuperado el 05 de Diciembre de 2016
- Silos, J. (2008). *Manual de lucha contra la contaminación por hidrocarburos*. España: Gráficas La Paz. Recuperado el 20 de Noviembre de 2016
- Speigh, J., & Arjoon, K. (2012). *Bioremediation of petroleum products*. *Scrivener Wiley*. Recuperado el 25 de Septiembre de 2016
- Speight, J. (2012). *Crude Oil Assay Database*. New York: Elsevier-Knovel. Recuperado el 25 de Septiembre de 2016
- Speight, J. (2014a). *The Chemistry and Technology of Petroleum*. Boca Ratón: Taylor & Francis Group. Recuperado el 25 de Septiembre de 2016
- Speight, J. (2014b). *High Acid Crudes*. Oxford: Elsevier. Recuperado el 25 de Septiembre de 2016
- Speight, J. (2015). *Handbook of Petroleum Product Analysis*. New Jersey: Wiley. Recuperado el 25 de Septiembre de 2016
- Tellería, J. (2013). *Pérdida de biodiversidad. Causas y consecuencias de la desaparición de las especies*. España. Recuperado el 20 de Noviembre de 2016

- Texaco. (2010). *Texaco en Ecuador*. Recuperado el 03 de Octubre de 2016, de Información sobre las actividades pasadas de Texaco Petroleum Company en Ecuador.
- Tolgyessy, J. (2003). *Chemistry and Biology of Water, Air and Soil: Environmental Aspects*. Holanda: Elsevier. Recuperado el 02 de Septiembre de 2016
- Torres, K., & Zuluaga, T. (2009). *Biorremediación de suelos cotaminados por hidrocarburos*. Medellín. Recuperado el 20 de Septiembre de 2016
- U.S. Oil & Refining Co. (2013). *Material safety data sheet Jet Fuel*. Tacoma. Recuperado el 12 de Septiembre de 2016
- UNAD. (2015). *Propiedades y Contaminación del Suelo*. Recuperado el 18 de Octubre de 2016, de HUMEDAD, INFILTRACIÓN, PERMEABILIDAD, CONSISTENCIA Y PROFUNDIDAD EFECTIVA DEL SUELO: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/358013/ContenidoEnLinea/leccin_8_humedad_infiltracin_permeabilidad_consistencia_y_profundidad_efectiva_del_suelo.html
- UNAM. (2008). Rocas relacionadas a los yacimientos petroleros. En UNAM. México. Recuperado el 20 de Septiembre de 2016
- Vega, E., & Hernandez, M. (2012). *Hidrocarburos Alifáticos*. Mexico: SUV. Recuperado el 21 de Septiembre de 2016
- Villegas, L., Martínez, M., Rodríguez, A., & Amoroso, M. (2014). Microbia Consortis, a Viable Alternative for Cleanup of Contaminated Soils. En A. Alvarez, & M. Polti, *Biorremediation in Latin America* (pág. 136). New York: Springer. Recuperado el 26 de Agosto de 2016
- Vinothini, C., Sudhakar, S., & Ravikumar, R. (2015). Biodegradation of petroleum and crude oil by *Pseudomonas putida* and *Bacillus cereus*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. Recuperado el 05 de Septiembre de 2016

- Volke, T. (2002). Biorremediación de suelos contaminados. *Bio Tecnología*. Recuperado el 18 de Septiembre de 2016
- Volke, T., & Velasco, J. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. México. Recuperado el 03 de Septiembre de 2016
- Weber, J., Karczewska, A., Drozd, J., Licznar, M., Licznar, S., Jamroz, E., & Kocowicz, A. (2007). Agricultural and ecological aspects of a sandy soil. *Elsevier*. Recuperado el 03 de Septiembre de 2016
- Wood Mackenzie. (2014). *Contry Report: Ecuador Risk Profile*. United Kingdom. Recuperado el 03 de Septiembre de 2016
- Wurst, S., De Deyn, G., & Orwin, K. (2012). Soil Biodiversity and Functions. En D. Wall, *Soil Ecology and Ecosystem Services*. United Kingdom: Oxford. Recuperado el 25 de Octubre de 2016
- Zambrano, M., Robinson, C., Prada, J., Arencibia, G., Vidal, A., & Capetillo, N. (2012). Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Anadara tuberculosa*. *Scielo*. Recuperado el 20 de Noviembre de 2016
- Zamora, A., Ramos, J., & Arias, M. (2012). Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de Sabana. *Redalyc*, 5-6. Recuperado el 29 de Noviembre de 2016
- Zamora, A., Ramos, J., & Arias, M. (2012). Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de Sabana. *Bioagro*. Recuperado el 29 de Noviembre de 2016
- Zawierucha, I., & Grzegorz, M. (2011). Bioremediation of Contaminated Soils: Effects of Bioaugmentation and Bioestimulation on Enhancing Biodegradation of Oil Hydrocarbons. En A. Singh, & N. K. Parmar, *Bioaugmentation, Bioestimulation and Biocontrol* (págs. 187-188). New York: Springer. Recuperado el 26 de Noviembre de 2016
- Zawierucha, I., & Malina, G. (2011). Bioremediation of contaminated soils: effects of bioaugmentation and biostimulation on enhancing

biodegradation of oil hydrocarbons. En A. Singh, *Bioaugmentation, Bioestimulation and Biocontrol*. Berlin: Springer. Recuperado el 03 de Noviembre de 2016

Zeng, G., Huang, D., Huang, G., TianJue, H., Jiang, X., Feng, C., . . . Liu, H. (2007). Composting of lead-contaminated solid waste with inocula of white-rot fungus. *Elsevier*. Recuperado el 04 de Noviembre de 2016

ANEXOS

Anexo 1. Imágenes de lugar de muestreo, muestras de suelos contaminados con hidrocarburos y suelos con crudo intemperizado.




Figura 30. Imágenes del Lugar de muestreo.



Figura 31. Imágenes de las muestras de suelos contaminados con hidrocarburos y crudo intemperizado.

Anexo 2. Informe de la concentración de la Gasolina Blanca en unidades de ppm, mediante el Análisis de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP's) llevado a cabo por el laboratorio ChávezSolutions Ambientales Cía. Ltda.



LABORATORIO RECEPTOR
 8001 BOGOTÁ
 VCL 8001 00000000

**INFORME DE RESULTADOS
LABORATORIO QUÍMICO AMBIENTAL**


ANÁLISIS: Recuento de Nuevos de Agua CEN: NA E: 400114
 MCC: 1
 Revisión: 7
 Orden de Trabajo N°: OT - 2016 - A - 215

CLIENTE: EMPRESA: Miguel Quintero DIRECCION: NA TELEFONO: NA SOLICITADO POR: NA PROCEDIMIENTO DE TOMA DE MUESTRAS: NA	TIPO DE MUESTRA: Combustible CODIGO DE MUESTRA: NA CUARTO RECEPTOR: NA LOCALIZACIÓN DE DESCARGA: NA
--	--


CONDICIONES AMBIENTALES	HUMEDAD (%)	W	W	W	W	W	W	W	W
	TEMP. AMBI. (°C)	W	W	W	W	W	W	W	W
COORDENADAS EN EL PUNTO DE MUESTREO		W	W	W	W	W	W	W	W
TECNICO RESPONSABLE DE LA TOMA DE MUESTRA		W	W	W	W	W	W	W	W
TIPO DE TOMA DE MUESTRA		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
FECHA DE TOMA DE MUESTRA		30/08/16	30/08/16	30/08/16	30/08/16	30/08/16	30/08/16	30/08/16	30/08/16
HORA DE TOMA DE MUESTRA		12:30	12:30	12:30	12:30	12:30	12:30	12:30	12:30
FECHA DE INGRESO DE MUESTRA		31/08/16	31/08/16	31/08/16	31/08/16	31/08/16	31/08/16	31/08/16	31/08/16
HORA DE INGRESO		11:30	11:30	11:30	11:30	11:30	11:30	11:30	11:30
FECHA DE ANÁLISIS		31/08/16	31/08/16	31/08/16	31/08/16	31/08/16	31/08/16	31/08/16	31/08/16
FECHA DE REALIZACIÓN DE INFORME		12/10/16	12/10/16	12/10/16	12/10/16	12/10/16	12/10/16	12/10/16	12/10/16
ANALISTA RESPONSABLE DE ELABORACIÓN DE INFORME		Carla Molina	Carla Molina	Carla Molina	Carla Molina	Carla Molina	Carla Molina	Carla Molina	Carla Molina

PARAMETRO	UNIDAD	VALOR REAL PERMISIBLE	MÉTODO	V. FIC	Especial		COMPLETADO
					W	NA	
Hydrocarburos Totales de Petróleo	mg/L	NA	FE221 EPA 821.1-107	NA	20000	NA	NA

(1) Los símbolos e interpretaciones que se indican a continuación, están basados en el estándar de la OMS



OT - 2016 - A - 215
RESPONSABLE TÉCNICO



NOTA: O= Cumple con la norma, NC=No cumple con la norma, NA= No evaluado por el cliente, NA=No aplica
 (ppm= Standard Method, EPA=Environmental Protection Agency, TOCC= Total Organic Carbon, C= Carbono)
 FE= Fecha de Emisión de la Norma

- El informe solo aplica a las muestras analizadas y enviadas.
 - Prohibida la reproducción parcial, por cualquier medio, sin el permiso escrito del laboratorio.
 - Los análisis marcados con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación de SAZ.
 - El valor obtenido en el punto de descarga superior.

Anexo 3. Número de colonias evidenciadas en cada una de las disoluciones sembradas provenientes de las distintas muestras ensayadas. Además, del cálculo de la concentración total en unidades de UFC's/mL.

Tabla 14.

Concentración total en unidades de UFC's/mL de los cultivos mixtos obtenidos a partir de la siembra de las diluciones de las muestras de suelo.

Muestra	Dilución	Cuento en placa		UFC's/mL *
		48 horas	72 horas	
1	10^{-1}	37	-	74×10^{-3}
	10^{-2}	44	-	88×10^{-4}
	10^{-3}	19	-	38×10^{-5}
	10^{-4}	-	2 **	40×10^{-5}
	10^{-5}	-	8	160×10^{-6}
	10^{-6}	-	3	60×10^{-7}
2	10^{-1}	2 **	-	40×10^{-2}
	10^{-2}	Incontable	-	Incalculable
	10^{-3}	32	-	64×10^{-5}
	10^{-4}	-	14	280×10^{-5}
	10^{-5}	-	18	36×10^{-7}
	10^{-6}	-	6	120×10^{-7}
3	10^{-1}	Incontable	-	Incalculable
	10^{-2}	Incontable	-	Incalculable
	10^{-3}	36	-	72×10^{-5}
	10^{-4}	-	2 **	40×10^{-5}
	10^{-5}	-	2 **	4×10^{-7}
	10^{-6}	-	1 **	200×10^{-6}
4	10^{-1}	5	-	100×10^{-2}
	10^{-2}	11	-	220×10^{-3}
	10^{-3}	5	-	100×10^{-4}
	10^{-4}	-	2 **	40×10^{-5}
	10^{-5}	-	38	76×10^{-7}
	10^{-6}	-	5	100×10^{-7}
5	10^{-1}	Incontable	-	Incalculable
	10^{-2}	38	-	76×10^{-4}
	10^{-3}	12	-	240×10^{-4}
	10^{-4}	-	12	240×10^{-5}
	10^{-5}	-	5	100×10^{-6}
	10^{-6}	-	7	140×10^{-7}
6	10^{-1}	Incontable	-	Incalculable

10^{-2}	Incontable	-	Incalculable
10^{-3}	56	-	112×10^{-5}
10^{-4}	-	49	98×10^{-6}
10^{-5}	-	27	54×10^{-7}
10^{-6}	-	32	64×10^{-8}

* Valor estimado

** No representativo. Valor debe estar en un rango de 3 - 300 UFC's por placa.

Anexo 4. Imágenes de algunos de los cultivos puros de las 12 colonias obtenidas en la etapa de aislamiento bacteriano.

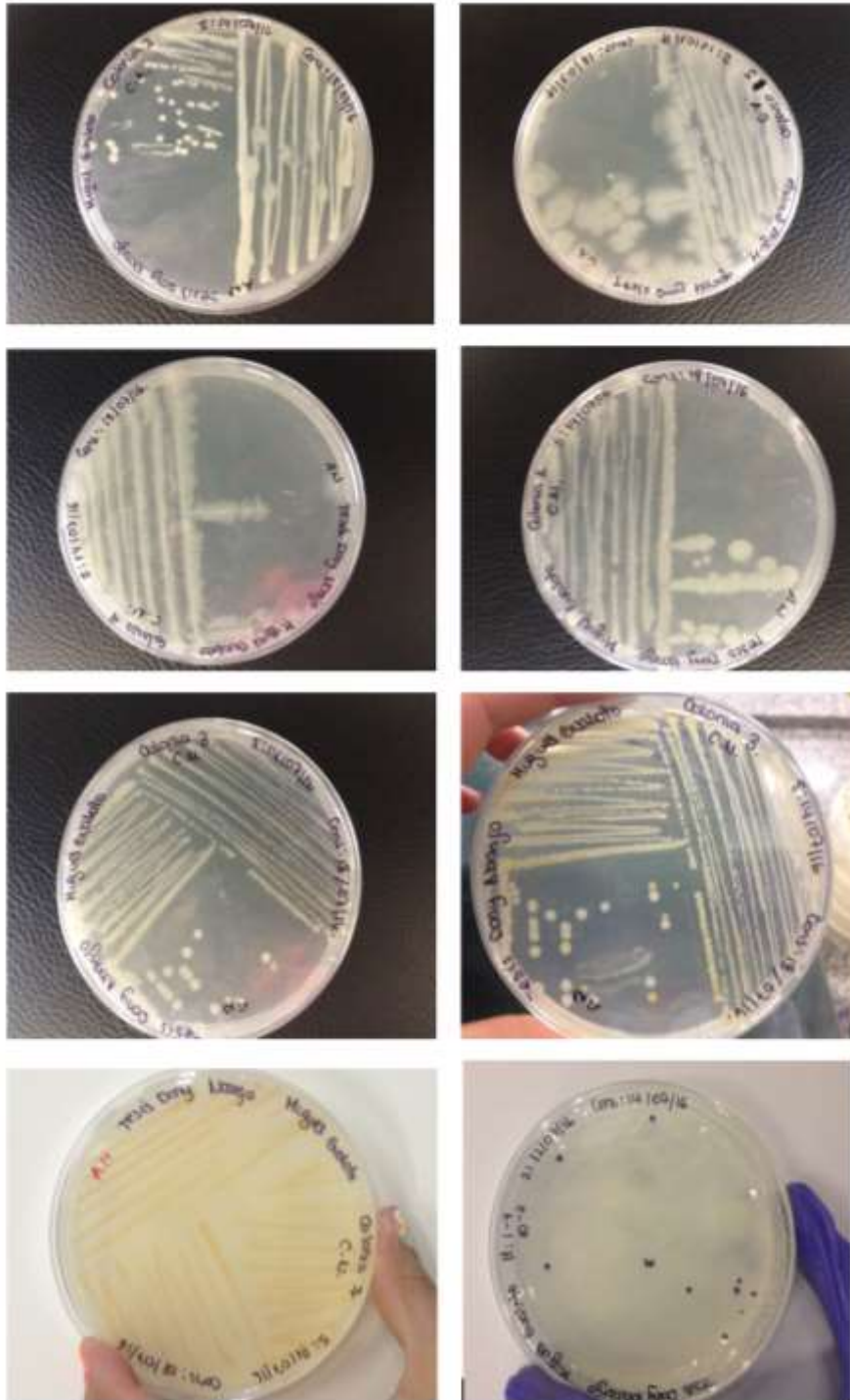


Figura 32. Cultivos puros de las colonias aisladas a partir de las muestras de suelo.

Anexo 5. Subconjuntos formados por las colonias ensayadas en la Etapa 3: Ensayo de turbidez, de acuerdo al crecimiento bacteriano por turbidez en unidades de NTU's, en los periodos 28, 46 y 50 días.

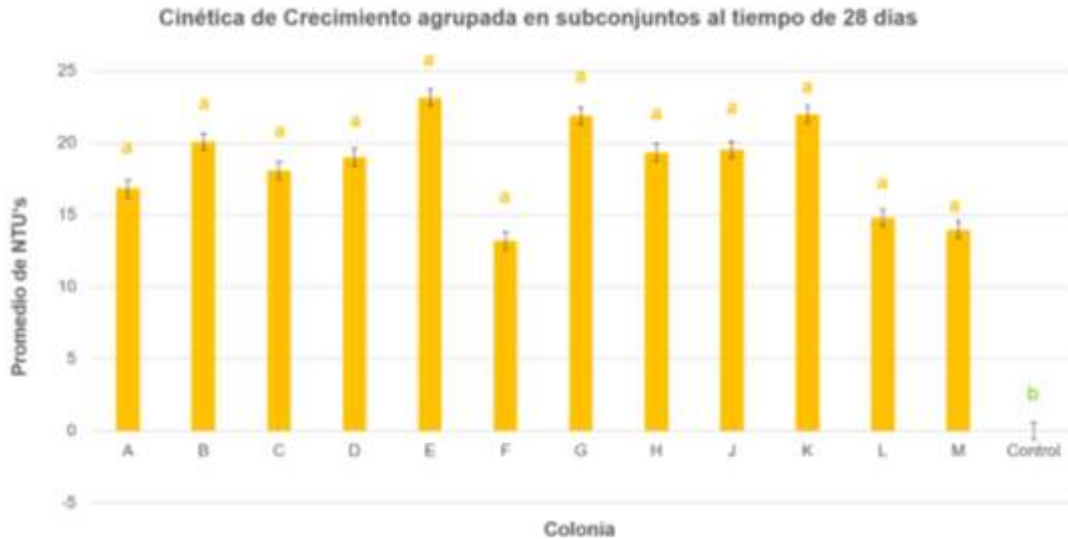


Figura 33. Cinética de Crecimiento de las colonias ensayadas representada en subconjuntos. El análisis estadístico revela dos subconjuntos al tiempo de 28 días. (a en barra mostaza = subconjunto con mayor crecimiento bacteriano) (b sin barra = sin crecimiento bacteriano) y error estándar (0,60).

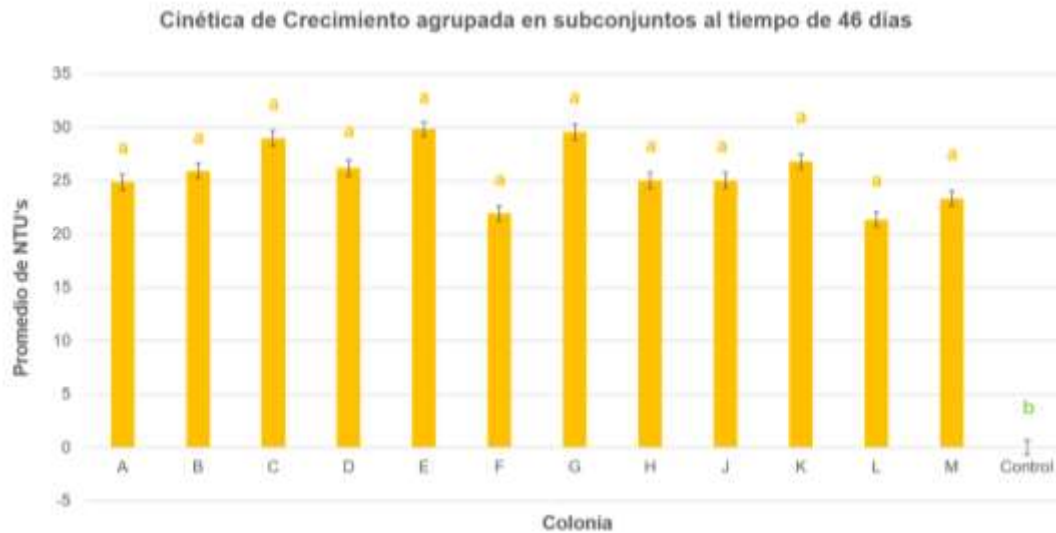


Figura 34. Cinética de Crecimiento de las colonias ensayadas representada en subconjuntos. El análisis estadístico revela dos subconjuntos al tiempo de 46 días. (a en barra mostaza = subconjunto con mayor crecimiento bacteriano) (b sin barra = sin crecimiento bacteriano) y error estándar (0,71).

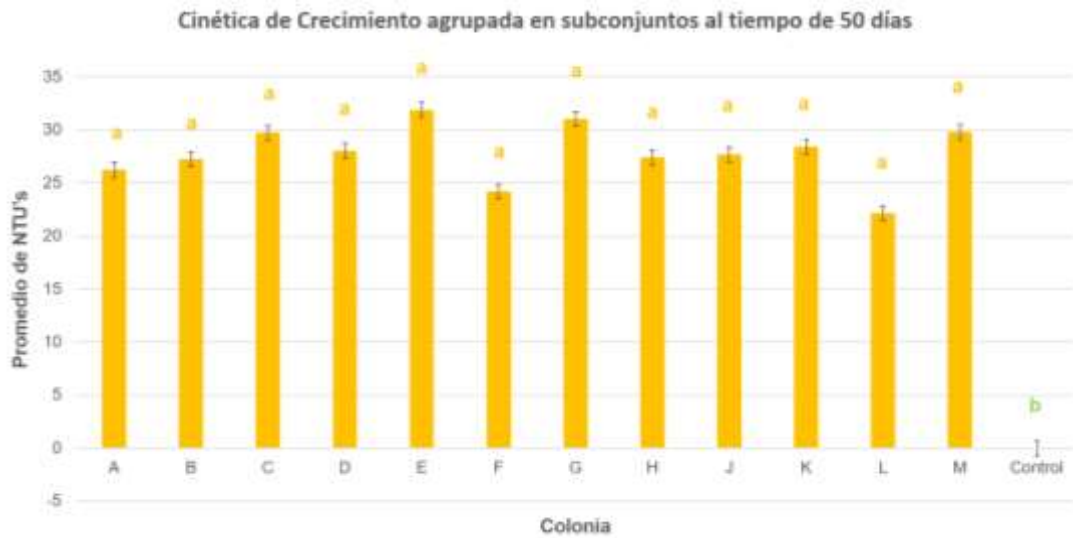


Figura 35. Cinética de Crecimiento de las colonias ensayadas representada en subconjuntos.

El análisis estadístico revela dos subconjuntos al tiempo de 50 días. (a en barra mostaza = subconjunto con mayor crecimiento bacteriano) (b sin barra = sin crecimiento bacteriano) y error estándar (0,71).

Anexo 6. Ensayo de turbidez.

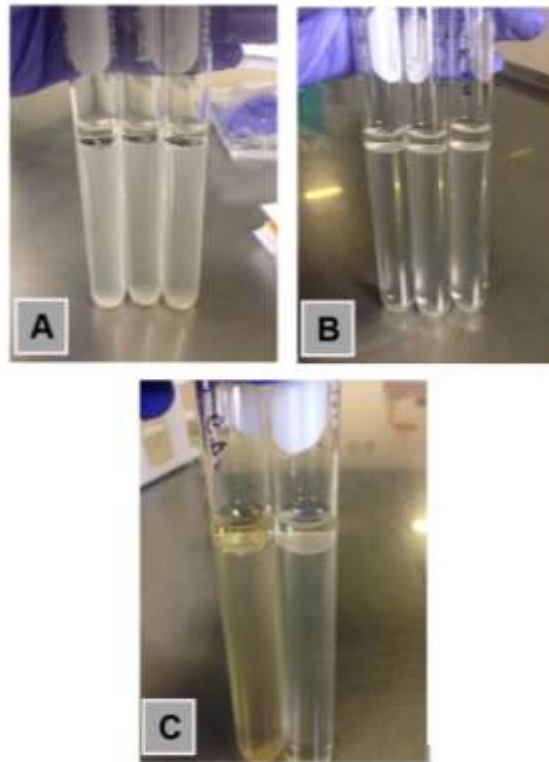


Figura 36. **A** es una colonia con capacidad de degradar Gasolina Blanca, **B** es una colonia sin capacidad de degradar Gasolina Blanca, **C** indica el cambio de color de la Gasolina Blanca cuando se presenta el caso A (izquierda) y el caso B (derecha). Capacidad de degradar = Turbidez en el medio = Crecimiento bacteriano.

Anexo 7. Tinción Gram y morfología de las colonias E, J y K.

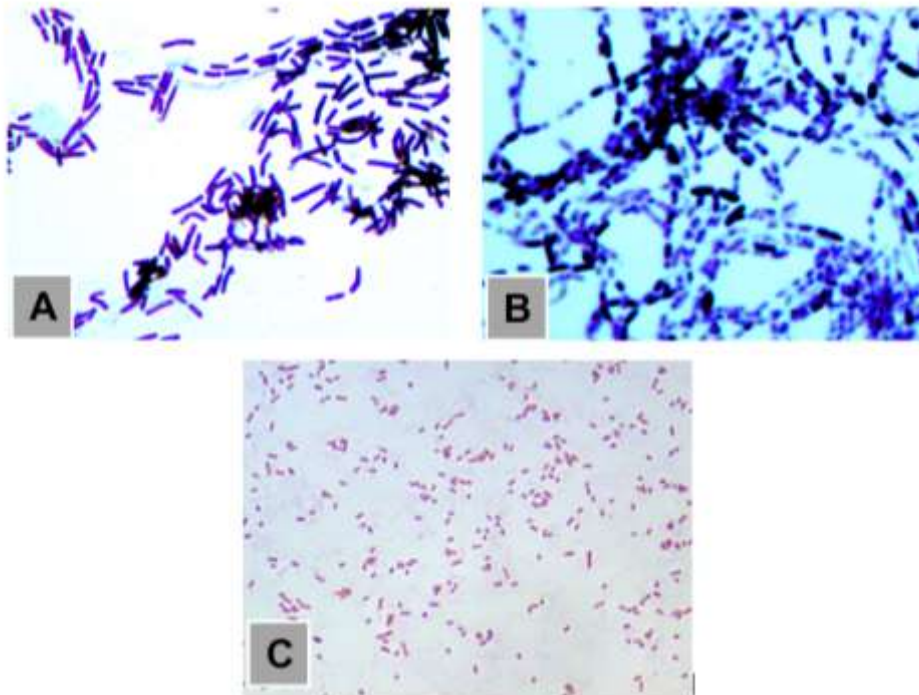


Figura 37. **A** es la colonia E con morfología en pares (Diplobacilos) y Gram +, **B** es la colonia J con morfología en segmentos (Estreptobacilos) y Gram +, **C** es la colonia K con morfología en simples (Bacilos) y Gram -. Las placas de tinción Gram A y B se observaron en un aumento de 1000X (100x lente objetivo y 10X lente ocular). Mientras la placa C a 400x (40X lente objetivo y 10X lente ocular).

Anexo 8. Tablas de UFC's contadas y cálculos para poder llevar a cabo la Cinética de crecimiento bacteriana.

Tabla 15.

Conteo de UFC's en placa luego de 24 horas de incubación tras la siembra de 5 uL de la solución diseñada en el matraz Erlenmeyer durante el Ensayo de tasa de crecimiento bacteriano y tasa de degradación.

Referencia Colonia	R	Conteo en placa						
		0 horas	4 horas	24 horas	7 días	14 días	21 días	28 días
Colonia E	1	67	68	32	44	352*	70	21
	2	90	92	48	300	264	110	61
	3	44	47	17	116	64	42	45

Colonia J	1	79	80	14	180	204	28	60
	2	47	48	13	172	70	85	123
	3	75	76	14	60	110	17	75
Colonia K	1	183	184	39	108	120	60	50
	2	131	132	36	212	80	158	111
	3	105	108	15	20	180	60	90
Factor de Dilución		SFD	SFD	10^{-1}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-3}

R hace referencia al número de Repetición.

SFD hace referencia a sin factor de dilución.

* Valor fuera de rango, no extrapolable. Valor debe estar en un rango de 3 - 300 UFC's por placa.

Tabla 16.

UFC's totales en placa por cada 5 uL, durante el Ensayo de tasa de crecimiento bacteriano y tasa de degradación.

Referencia Colonia	R	Conteo en placa * Factor de Dilución						
		0 horas	4 horas	24 horas	7 días	14 días	21 días	28 días
Colonia E	1	67	68	320	440	35200	70000	21000
	2	90	92	480	3000	26400	110000	61000
	3	44	47	170	1160	6400	42000	45000
Colonia J	1	79	80	140	1800	20400	28000	60000
	2	47	48	130	1720	7000	85000	123000
	3	75	76	140	600	11000	17000	75000
Colonia K	1	183	184	390	1080	12000	60000	50000
	2	131	132	360	2120	8000	158000	111000
	3	105	108	150	200	18000	60000	90000

R hace referencia al número de Repetición.

SFD hace referencia a sin factor de dilución.

Para obtener los datos de la *Tabla 17*, lo que se hizo fue multiplicar el valor de la *Tabla 16* por 1000 uL y dividirlo para 5 uL.

Tabla 17.

UFC's/ mL, durante el Ensayo de tasa de crecimiento bacteriano y tasa de degradación.

Referencia Colonia	R	UFC's / mL						
		0 horas	4 horas	24 horas	7 días	14 días	21 días	28 días
Colonia E	1	13400	13600	64000	88000	7040000	14000000	4200000

	2	18000	18400	96000	600000	5280000	22000000	12200000
	3	8800	9400	34000	232000	1280000	8400000	9000000
Colonia J	1	15800	16000	28000	360000	4080000	5600000	12000000
	2	9400	9600	26000	344000	1400000	17000000	24600000
	3	15000	15200	28000	120000	2200000	3400000	15000000
Colonia K	1	36600	36800	78000	216000	2400000	12000000	10000000
	2	26200	26400	72000	424000	1600000	31600000	22200000
	3	21000	21600	30000	40000	3600000	12000000	18000000

R hace referencia al número de Repetición.

SFD hace referencia a sin factor de dilución.

Anexo 9. Medición de la absorbancia de la fenolftaleína en el Ensayo de degradación.

Tabla 18.

Unidades de absorbancia obtenidos de cada una de las repeticiones del Ensayo de degradación.

Referencia Colonia	Repetición	Absorbancia			
		7 días	14 días	21 días	28 días
Colonia E	1	0,664	0,659	0,557	0,557
	2	0,598	0,528	0,456	0,432
	3	0,613	0,518	0,442	0,398
Colonia J	1	0,540	0,485	0,438	0,435
	2	0,588	0,519	0,447	0,433
	3	0,575	0,477	0,401	0,389
Colonia K	1	0,553	0,514	0,488	0,441
	2	0,656	0,525	0,422	0,421
	3	0,651	0,601	0,548	0,548

Una vez obtenida la absorbancia a 550nm de cada una de las repeticiones de las colonias, se procedió a realizar el cálculo de la concentración de NaOH en unidades de Normalidad, a partir de la ecuación obtenida de la curva estándar de la fenolftaleína (misma que se muestra a continuación en recuadro celeste).

$$y = 0,5658x + 0,2267$$

$$R^2 = 0,9977$$

Tabla 19.

Concentración de Hidróxido de Sodio calculado a partir de la ecuación que describe la curva estándar de la fenoltaleína en presencia de esta base.

Referencia Colonia	Repetición	Concentración de NaOH (N)			
		7 días	14 días	21 días	28 días
Colonia E	1	0,773	0,764	0,584	0,584
	2	0,656	0,533	0,405	0,363
	3	0,683	0,515	0,381	0,303
Colonia J	1	0,554	0,457	0,373	0,368
	2	0,639	0,517	0,389	0,365
	3	0,616	0,442	0,308	0,287
Colonia K	1	0,577	0,508	0,462	0,379
	2	0,759	0,527	0,345	0,343
	3	0,750	0,662	0,568	0,568

A partir de la concentración de NaOH se procedió a realizar el cálculo de la concentración de Gasolina Blanca consumida en unidades de ppm. Para lo cual, se empleó la relación que se muestra a continuación en recuadro gris.

$$\text{moles CO}_2 * \frac{1 \text{ mol (GB)}}{14 \text{ mol CO}_2} * \frac{198 \text{ gramos}}{1 \text{ mol (GB)}} * \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ gramo}} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ Litro}} * \frac{1 \text{ Litro}}{101 \text{ mL}}$$

Donde: GB es Gasolina Blanca, y 101 mL es el volumen de solución empleado en el matraz Erlenmeyer (1 mL de inóculo de bacterias + 100 mL de solución salina nutritiva)

Tabla 20.

Concentración de Gasolina Blanca consumida en unidades de ppm, en cada uno de los periodos de tiempo ensayados.

Referencia Colonia	Repetición	Gasolina Blanca consumida (ppm)			
		7 días	14 días	21 días	28 días
Colonia E	1	108226,18	106988,74	46676,08	0,00
	2	91892,02	74567,91	56748,83	38682,25
	3	95604,33	72093,04	53284,01	40909,63

Colonia J	1	77537,76	63925,96	52294,06	51530,41
	2	89478,08	72394,63	54521,44	45496,86
	3	86199,81	61946,06	43137,03	40167,18
Colonia K	1	80755,09	71103,09	64668,42	45364,40
	2	106246,28	73825,45	48334,26	33485,01
	3	105008,84	92634,48	64247,68	0,00

Una vez conocida la cantidad de Gasolina Blanca consumida en cada periodo, se procedió a realizar el cálculo de la concentración de la misma, restando el consumo de gasolina en cada periodo de la concentración inicial (261891 ppm).

Tabla 21.

Concentración de Gasolina Blanca en unidades de ppm, los datos indican la concentración remanente del hidrocarburos en cada uno de los periodos de tiempo ensayados, recordando que la concentración inicial era de 261891 ppm.

Referencia Colonia	Repetición	Concentración de la Gasolina Blanca (ppm)			
		7 días	14 días	21 días	28 días
Colonia E	1	153664,82	46676,08	0,00	0,00
	2	169998,98	95431,07	38682,25	0,00
	3	166286,67	94193,64	40909,63	0,00
	Promedio	163316,83	78766,93	26530,63	0,00
Colonia J	1	184353,24	120427,29	68133,23	16602,82
	2	172412,92	100018,30	45496,86	0,00
	3	175691,19	113745,13	70608,10	30440,92
	Promedio	177485,79	111396,90	61412,73	15681,25
Colonia K	1	181135,91	110032,82	45364,40	0,00
	2	155644,72	81819,27	33485,01	0,00
	3	156882,16	64247,68	0,00	0,00
	Promedio	164554,26	85366,59	26283,14	0,00

Anexo 10. Ensayo de degradación.



Figura 38. Imágenes del ensayo de degradación llevado a cabo en matraces Erlenmeyer como se mostró esquemáticamente en la Figura 15.

A es la Colonia E, **B** es la Colonia J y **C** es la colonia K. Se muestra el comportamiento a los 14 días. Todas las imágenes son de la repetición número 1 de cada colonia.

Anexo 11. Oficio Permiso de Muestreo de suelos contaminados con hidrocarburo de la Comunidad de Lumbaqui, Provincia de Sucumbíos.



**GOBIERNO AUTÓNOMO DESCENTRALIZADO
MUNICIPAL DEL CANTÓN GONZALO PIZARRO**
Lumbaqui – Sucumbíos - Ecuador
GESTION AMBIENTAL



Lumbaqui, 31 de enero de 2017
OFICIO N° 066- DGA -GADMGP -2017

Señora
Vivian Morera Córdova
Directora Académica Ingeniería en Biotecnología
Universidad de las Américas
Presente


De mis consideraciones. -

Reciba un saludo cordial del Municipio de Gonzalo Pizarro y por nuestro intermedio a todos quienes laboran bajo su acertada dirección.

Por medio del presente autorizo a la señorita Daniela Carolina Naranjo González con CI: 1722343074, estudiante de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Américas, realice muestreo de suelos contaminados con hidrocarburos de los pasivos ambientales de Lumbaqui, Estación Tecp-Ecuador. Con la finalidad de realizar la búsqueda y aislamiento de un consorcio microbiano con capacidad para degradar hidrocarburos, tema que ha servido de base para la redacción de su tesis de pregrado **"Aislamiento e identificación de microorganismos con capacidad de degradar hidrocarburos, en suelos contaminados de la Comunidad Lumbaqui, Provincia de Sucumbíos"**.

Las muestras son tomadas en las siguientes coordenadas geográficas: N 00°03.222' W 077°18.663', N 00° 03.227 W 077° 18.657', N 00°03.231 W 077° 18.653, N 00° 03.240' W 077° 18.662, N 00°03.159' W 077°18.664', N 00°03.154' W 077°18.664', N 00°03.145' W 077°18.661', N 00°03.103' W 077°18.626', N 00°03.297' W 077°18.712'

Atentamente


Ing. Juan Pablo Morales
Director de Gestión de Ambiente
GAD – Gonzalo Pizarro



Acción	Nombre y Apellido	Firma	Designación
Elaborado por	Juan Pablo Morales		Director de Gestión de Ambiente <i>Discrecional: Alejandro Morera y Morera</i>

Contacto: 06 2340 204 / 06 2340 205
Mail: gomugop@yahoo.es
www.gonzalopizarro.gob.ec

