



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS
DEGRADORAS DE PETRÓLEO OBTENIDAS DE SUELOS
CONTAMINADOS DE LA PLATAFORMA DE TRATAMIENTO "EL
SALADO" (PROVINCIA DEL NAPO).

AUTORA

María Daniela Medina Espinosa

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS
DEGRADADORAS DE PETRÓLEO OBTENIDAS DE SUELOS
CONTAMINADOS DE LA PLATAFORMA DE TRATAMIENTO “EL SALADO”
(PROVINCIA DE NAPO).

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

Profesor guía

MSc Carlos Andrés Bastidas Caldés

Autora

María Daniela Medina Espinosa

Año

2017

DECLARACIÓN DEL DOCENTE GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, 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
Máster Universitario en Microbiología Avanzada
CI: 0201619806

DECLARACIÓN DEL DOCENTE 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
CI: 1758028896

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.”

Carlos Andrés Bastidas Caldés
Máster Universitario en Microbiología Avanzada
CI: 0201619806

DECLARACIÓN DE AUTORÍA 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.”

María Daniela Medina Espinosa

CI: 1720368933

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, porque sin ellos nada de esto sería posible.

A mi profesor guía Carlos Bastidas por su orientación y conocimientos a lo largo del desarrollo de este proyecto.

A Vivian Morera, al LQ3 y los Laboratorios de Ciencias Biológicas y Químicas de la UDLA por su colaboración en la parte experimental de este proyecto.

DEDICATORIA

Agradece a la llama su luz, pero no olvides el pie del candil que, constante y paciente la sostiene en la sombra (Rabindranath Tagore).

Dedico este trabajo a mis padres; por los esfuerzos y sacrificios que han hecho por mí, por criarme con integridad y amor.

A mi hermano, por su amistad y consejos.

A mis abuelos, tíos y primos; por todo su apoyo y cariño.

A Rafaela, Priscila, Daniela y Salomé; por su amistad incondicional.

RESUMEN

La actividad petrolera en el Ecuador es una de las principales fuentes de ingreso para el país, sin embargo como consecuencia de la explotación se produce la contaminación de la biosfera. Las técnicas biotecnológicas de remediación utilizan conocimientos de la biología para tratar ambientes contaminados; demuestran ser más eficaces comparadas con técnicas físico-químicas debido a que son de menor costo y porque se llevan a cabo menos operaciones unitarias, por lo que su aplicación resulta más práctica. El presente proyecto tuvo como objetivo aislar y caracterizar cepas bacterianas degradadoras de hidrocarburos, obtenidas a partir de suelos contaminados con petróleo de la plataforma de tratamiento "El Salado" (Napo, Ecuador). Para ello fue necesaria la selección de las cepas en un medio formulado con petróleo como la única fuente de carbono. Se diluyó las muestras de suelo, las diluciones fueron sembradas en medios con concentraciones de petróleo del 0.5% y 0.7% y se cuantificaron las colonias. Todas las cepas que crecieron en el medio fueron posteriormente aisladas en agar nutritivo. Para caracterizarlas se realizó una tinción Gram, se observó la morfología de las células y en base a estos datos se realizó la caracterización bioquímica (crecimiento en agar TSI, crecimiento en agar MacConkey, oxidasa y catalasa). Los resultados mostraron que el crecimiento microbiano de las muestras analizadas no se ve afectado significativamente por las concentraciones de petróleo usadas ni por las localidades muestreadas. Se obtuvieron nueve cepas aisladas, los distintos datos obtenidos de la caracterización sirvieron para tener una aproximación sobre los géneros a los que podrían pertenecer cada una de las bacterias capaces de metabolizar hidrocarburos. Las bacterias encontradas podrían llegar a tener tasas altas de degradación, ya sea por sí solas o por bioestimulación, siendo idóneas para la remediación de ambientes contaminados.

ABSTRACT

Oil industry has produced an important income for Ecuador, nevertheless pollution of the biosphere is a direct consequence of the exploitation. Remediation biotechnological techniques apply biological fundamentals to treat polluted environments, they appear more practical when compared with physicochemical techniques because of the lower costs and less unitary operations during the process. The aim of this project was to isolate and characterize crude oil degrading bacterial strains, obtained from crude oil contaminated samples from the treatment platform "El Salado" (Napo, Ecuador). To attain this, the strains were selected from a formulated media containing crude oil as the only carbon source. Samples were diluted and inoculated in media with crude oil (0.5% and 0.7%). All the strains that grew were isolated in nutrient agar. Gram stain and observation of the cell morphology were useful into defining the tests for biochemical characterization (growth on TSI agar, growth on MacConkey agar, oxidase y catalase). The results showed that microbial growth from analyzed samples was not significantly different between the two different crude oil concentrations used neither between locations. Nine strains were isolated and the obtained data was used to determine the possible genera these crude-oil-metabolizing bacteria could belong to. The bacteria found might have high degradation rates using biostimulation or by themselves, being suitable for the remediation of polluted environments.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema y justificación	2
1.3. Objetivos del trabajo	3
1.4. Justificación de la investigación	4
2. Marco teórico.....	5
2.1. Contexto petrolero y actividad extractiva en el Ecuador	5
2.2. Biorremediación	11
2.2.1. Atenuación natural.....	11
2.2.2. Bioestimulación.....	12
2.2.3. Bioaumento	12
2.3. Importancia y utilidad de la biorremediación.....	12
2.4. Hidrocarburos	13
2.4.1. Hidrocarburos alifáticos	14
2.4.2. Hidrocarburos aromáticos.....	15
2.4.3. Asfaltenos y resinas.....	16
2.5. Factores que influyen en la biorremediación	17
2.5.1. Factores en relación al contaminante	17
2.5.2. Factores en relación a los microorganismos	19
2.5.3. Factores en relación al medio ambiente	26
2.6. Bioaumento en suelos contaminados.....	32
2.7. Bioestimulación en suelos contaminados.....	33
2.8. Medios selectivos y diferenciales	34
2.9. Aislamiento de microorganismos.....	35
2.10. Géneros de importancia en la degradación de hidrocarburos	36
3. Diseño del plan experimental	37
3.1. Diagrama de flujo	39
4. Procedimientos.....	39

4.1. Determinación de la población y muestra.....	39
4.2. Procedimientos para obtención de datos.....	40
4.2.1. Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos.....	40
4.2.2. Aislamiento y caracterización morfológica macroscópica.....	42
4.2.3. Caracterización morfológica microscópica	43
4.2.4. Caracterización bioquímica	43
4.2.5. Aproximación sobre los géneros bacterianos	45
4.2.6. Determinación del género <i>Pseudomonas</i>	45
4.2.7. Conservación.....	45
4.3. Evaluación estadística de los resultados	45
5. Resultados y discusión	46
5.1. Muestreo.....	46
5.2. Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos.....	46
5.2.1. Oleoducto San Miguel Lago Agrio kilómetro 2 (OSLA K2):	47
5.2.2. Oleoducto San Miguel Lago Agrio kilómetro 14 (OSLA K14):	48
5.2.3. Sistema de Oleoductos Transecuatoriano kilómetro 105 (SOTE K105):	49
5.2.4. Sistema de Oleoductos transecuatoriano kilómetro 110 (SOTE K110):	50
5.3. Aislamiento.....	51
5.4. Caracterización morfológica microscópica	53
5.5. Caracterización bioquímica.....	55
5.5.1. Producción de ácido en agar TSI.....	56
5.5.2. Crecimiento en agar MacConkey.....	56
5.5.3. Oxidasa	57
5.5.4. Catalasa	58
5.6. Aproximación sobre los géneros bacterianos.....	58
5.6.1. OSLA K2.....	58
5.6.2. OSLA K14.....	59
5.6.3. SOTE K105	59
5.6.4. SOTE K110	60
5.7. Identificación del género <i>Pseudomonas</i>	61

5.8. Análisis estadístico de los resultados	62
5.8.1. Análisis de la variable concentración de petróleo	62
5.8.2. Análisis de la variable localidad	64
6. Conclusiones y recomendaciones	66
6.1. Conclusiones	66
6.2. Recomendaciones.....	67
REFERENCIAS	69
ANEXOS	81

1. Introducción

1.1. Antecedentes

El aumento de la demanda de hidrocarburos durante el último siglo ha obligado a las industrias a incrementar el volumen de explotación de este recurso. Como consecuencia de su explotación se produce contaminación en la biosfera (Oilwatch, 2005, p. 23).

Los hidrocarburos son moléculas formadas por la unión de átomos de carbono e hidrógeno en distintas combinaciones. Existen varias investigaciones sobre los efectos adversos de estas sustancias sobre la salud humana y los ecosistemas (Castillo y Bárcenas, 1997, p. 21).

El aumento en los niveles de contaminación por diferentes compuestos ha sido una causa que ha impulsado el desarrollo de las técnicas de remediación. El proceso de remediación consiste en la aplicación de una o una serie de operaciones unitarias que alteran la composición de una sustancia peligrosa a través de acciones químicas, biológicas o físicas; reduciendo su movilidad, toxicidad y el volumen de dicha sustancia (Velasco y Volke, 2002, p. 27)

En el pasado las técnicas más utilizadas para la remediación se basaban en métodos físico-químicos de aplicabilidad limitada, costosos y que modifican los ecosistemas de forma irreparable (Becerril *et al.*, 2002, p. 1).

Las técnicas biotecnológicas de remediación empiezan a surgir en la década de los setentas, las mismas utilizan conocimientos de la biología para tratar ambientes contaminados. Demuestran ser más eficaces comparadas con técnicas físico-químicas debido a que son de menor costo, son más prácticas para el tratamiento de suelos y aguas porque se llevan a cabo menos operaciones unitarias (Álvarez e Illman, 2006, pp. 14-15). Entre los métodos de

remediación biotecnológica podemos mencionar la biorremediación (que utiliza microorganismos) y la fitorremediación (que utiliza plantas).

Diversos mecanismos de adaptación utilizados por los microorganismos para sobrevivir a los ambientes contaminados, han sido la clave para el nacimiento de las técnicas de tratamiento biotecnológicas. Trabajos de investigación como el de Li, Huang, Lerner y Zhang (2000, p. 3852), demostraron que en contaminaciones petroleras en suelo ocurridas hace más de 25 años se encuentran microorganismos capaces de cumplir un rol importante en la biorremediación de hidrocarburos, incluso mediante atenuación natural. Por ello, la importancia de encontrar microorganismos idóneos para remediación biotecnológica en este tipo de contaminaciones.

Para llevar a cabo las diferentes técnicas de biorremediación (bioaumento o bioestimulación) es necesario tener conocimiento sobre algunas características de los microorganismos como su crecimiento o requerimientos nutricionales (Álvarez e Illman, 2006, p. 498). En las últimas décadas se ha investigado cepas degradadoras de hidrocarburos; como los estudios de Viñas (2005, p. 7), el cuál orientó su trabajo a la caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica de suelos contaminados por hidrocarburos. Otro estudio importante fue el de Vivas, Martínez, García y Salgado (2008, p. 51) sobre la caracterización metabólica y molecular de cepas degradadoras de parafinas.

1.2. Planteamiento del problema y justificación

La producción de compuestos industriales de origen mineral se ha incrementado de manera sustancial desde inicios del siglo XIX. Esto ha ocurrido gracias al nacimiento de industrias que elaboran nuevos materiales y que cambiaron el estilo de vida de la humanidad (Zurfluh, 1992, p. 80). Productos derivados del petróleo como la gasolina, los plaguicidas, los disolventes y los fertilizantes permiten mejorar las condiciones de vida. Sin embargo, provocan la contaminación de las aguas, el suelo y el aire. Este tipo de compuestos resultan

tóxicos para la mayoría de formas de vida (Bravo, 2007, p. 4).

En Ecuador ocurrieron 991 derrames en el período de 1994 a 2002, algunos ocurrieron por fallas en los equipos, negligencias de operación y otros provocados (Fontaine, 2003, pp. 43, 59, 61). Gran parte de los mismos ocurre en la región amazónica. Aquí se localizan la mayor cantidad de yacimientos petroleros; los que constituyen una amenaza constante para los suelos, los ríos, las comunidades y la biodiversidad en general.

Los hidrocarburos son los compuestos que forman el petróleo, son persistentes en el ambiente y tóxicos para la mayoría de formas de vida (Seymour y Henry, 2001, p. 551) (Cabildo *et al.*, 2013, p. 475).

Algunas estrategias de remediación que pretenden eliminar estos contaminantes del ambiente, utilizan métodos físico-químicos. Sin embargo estos procedimientos son costosos, modifican el ecosistema y no pueden aplicarse a todos los casos (Becerril *et al.*, 2002, p. 1).

1.3. Objetivos del trabajo

Objetivo general:

Obtener cepas bacterianas degradadoras de petróleo, a partir de muestras de suelo contaminado de la plataforma de tratamiento “El Salado” (Napo, Ecuador).

Objetivos específicos:

- Aislar cepas bacterianas degradadoras de hidrocarburos
- Caracterizar las cepas aisladas morfológica y bioquímicamente.

1.4. Justificación de la investigación

La mayoría de veces los ecosistemas no aportan con las condiciones adecuadas para llevar a cabo la biorremediación, por lo que en muchas ocasiones la atenuación natural no es suficiente para llevar a cabo la biorremediación en suelos contaminados. Por lo tanto, la introducción de microorganismos degradadores al suelo (bioaumentación) o la adición de nutrientes al suelo para aumentar la tasa de crecimiento de microorganismos degradadores (bioestimulación) son considerados los métodos más eficaces para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos (Sánchez y Rodríguez, 2003, pp. 14-15).

Sin embargo, cuando se trata de bioaumentación es preferible utilizar cepas autóctonas (Sánchez y Rodríguez, 2003, p. 13). El trabajo de algunos investigadores como Van Hamme, Singh y Ward (2003, p. 523) o Lee y Merlin (1999, p. 162), permitieron concluir que la adición de cultivos comerciales no aumenta significativamente la velocidad de degradación de los contaminantes comparada con la bioestimulación. Además el uso de cepas alóctonas requiere que la estrategia se lleve a cabo de manera *ex situ*, debido a que las cepas nativas están mejor adaptadas al medio ambiente y por ende compiten con los microorganismos degradadores alóctonos (Maier, Pepper y Gerba, 2009, p. 70).

Así mismo, el uso de microorganismos nativos es la mejor opción, debido a que el suelo no sufrirá cambios en su dinámica, además de actuar dentro de las leyes ecuatorianas con respecto al uso de la diversidad (Artículo 401 de la Constitución de la República del Ecuador, 2008, p. 179).

Para utilizar el bioaumentación mediante el uso cepas autóctonas o la estrategia de bioestimulación, es necesario conocer características importantes de los microorganismos como: las propiedades metabólicas, existencia de motilidad o tipificación Gram. Con el conocimiento de estas características se puede tener una aproximación sobre el género al que pertenece cada microorganismo

degradador (Pumarola, Rodríguez, García y Piedrola, 1987, p. 18) y es posible establecer las condiciones más idóneas durante el proceso de biorremediación, con la finalidad de que este proceso garantice el mayor crecimiento microbiano y por ende la mayor degradación del contaminante (Wong, Hong y Nolen, 1997, p. 137).

2. Marco teórico

2.1. Contexto petrolero y actividad extractiva en el Ecuador

Las primeras actividades exploratorias y extractivas ocurrieron en los territorios de lo que actualmente es la provincia de Santa Elena durante la primera presidencia de Eloy Alfaro (1897-1901). En 1921 se expide la Ley de Arrendamientos, primera ley relacionada a hidrocarburos en el país. Durante esta etapa el Estado arrienda terrenos a personas naturales o empresas en las Provincias de Guayas, Azuay, Manabí, Santa Elena y Cañar, los mismos son destinados a la explotación (Gordillo, 2004, p. 46) (Gordillo, 2004, p.68).

Esta ley disminuyó a menos de la mitad el beneficio que el Estado percibía por arrendamiento de terrenos para actividades relacionadas a la explotación minera (20%, establecido por la Corona española durante la Colonia), ley que continuaba en vigencia hasta 1921. En 1937 la ley se reforma y cambia de nombre a Ley del Petróleo, que establece la concesión como modelo contractual petrolero y que disminuye el beneficio del Estado por la actividad extractiva aún más (Gordillo, 2004, p. 46-47).

Para 1940 solo existen 9 concesiones en etapa de explotación en todo el territorio ecuatoriano, las demás concesiones habían sido explotadas en su totalidad, posiblemente subarrendadas por personas naturales a empresas

extranjeras. Hasta 1948 se arrendaron y concesionaron de manera indiscriminada y discrecional terrenos destinados a la explotación petrolera en las Regiones Litoral y Amazónica, sin respetar el máximo permitido por las leyes en las extensiones territoriales y sin proteger al Estado. Se llegaron a entregar hasta 10 millones de hectáreas en una sola región y a una sola empresa (Gordillo, 2004, p. 47-48).

Para 1971 el crecimiento económico del país no estaba acorde al consumo de energía, junto con el rápido deterioro del medioambiente por la contaminación producida por la falta de leyes y regulaciones. De manera que las operaciones petroleras que se realizaron por más de 70 años bajo las condiciones de compañías que evidentemente daban más prioridad a presupuestos operacionales (Gordillo, 2004, p. 49). Con la Ley de Hidrocarburos el presidente Velasco Ibarra elimina las concesiones como forma de contratación petrolera (Gordillo, 2004, p. 49), y el Estado llega a beneficiarse del 66% de los ingresos de la producción petrolera de Texaco-Gulf (Gordillo, 2004, p. 69).

En 1973, el Ecuador se unió a la Organización de Países Exportadores de Petróleo. Aunque se establecen los primeros contratos petroleros, las estipulaciones del contrato relacionadas a temas medioambientales eran tan solo declaraciones y el Estado no ejerce ningún control medioambiental sobre las explotaciones petroleras (Gordillo, 2004, p. 51).

La contaminación del aire, el suelo y el agua ocurrían de manera acelerada en Esmeraldas y la región Amazónica. Aunque leyes relacionadas con la prevención y control de la contaminación ambiental fueron expedidas en 1976 y 1981, no fueron aplicadas a las operaciones por no estar directamente relacionadas a la industria petrolera. En 1985 ante el reclamo de poblaciones afectadas y organizaciones ecologistas, las empresas deciden dar inicio al tratamiento de problemas ambientales. Sin embargo, al no existir el control del Estado, muchas veces solo se llegaba a acuerdos económicos con las poblaciones afectadas (Gordillo, 2004, p. 51).

En 1989 y 1992 se expiden regulaciones y reglamentos para el tratamiento de aguas y suelos respectivamente. En la nueva constitución de 1998, se incluye al medio ambiente como elemento prioritario del Estado, en 1999 se expide la Ley Ambiental y en 2001 entra en vigencia el Reglamento Ambiental para Operaciones Hidrocarburíferas (Gordillo, 2004, p. 53).

En los últimos años se han establecido lineamientos más estrictos con respecto al manejo ambiental de operaciones hidrocarburíferas, y sobre todo se han instaurado mecanismos de control. Las leyes que regulan la actividad petrolera actualmente son la Ley de Hidrocarburos (con varias reformas desde su expedición) y la Ley de fondo para el Ecodesarrollo Regional Amazónico; junto con otros reglamentos como el Reglamento para la información de la industria petrolera, el Reglamento ambiental de actividades hidrocarburíferas, el Reglamento a las reformas de la Ley de Hidrocarburos y el Reglamento de operaciones hidrocarburíferas, entre otros (Grupo Faro, s.f).

La Norma de Calidad Ambiental del Recurso Suelo y Criterios de Remediación Para Suelos Contaminados, emitida por el Ministerio del Ambiente de Ecuador, establece concentraciones máximas permitidas para hidrocarburos aromáticos en suelos no contaminados (Tabla 1) y para suelos contaminados después de la remediación (Tabla 2) (Ministerio del Ambiente de Ecuador, 2015).

Tabla 1.

Concentraciones máximas de hidrocarburos aromáticos permitidas en suelo

Parámetros orgánicos		
Benceno	mg/kg	0.03
Clorobenceno	mg/kg	0.1
Etilbenceno	mg/kg	0.1
Estireno	mg/kg	0.1
Tolueno	mg/kg	0.1
Xileno	mg/kg	0.1
PCBs	mg/kg	0.1
Clorinados Alifáticos (cada tipo)	mg/kg	0.1
Clorobencenos (cada tipo)	mg/kg	0.05
Hexaclorobenceno	mg/kg	0.05
Hexaclorociclohexano	mg/kg	0.01
Fenólicos no clorinados (cada tipo)	mg/kg	0.1
Clorofenoles (cada tipo)	mg/kg	0.05
Hidrocarburos totales (TPH)	mg/kg	<150
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) cada tipo	mg/kg	0.1

*Concentración en peso seco de suelo

Tomado de Ministerio del ambiente de Ecuador, 2015, p. 16.

Tabla 2.

Valores máximos de hidrocarburos permisibles después de la remediación

Parámetro	Unidades*	USO DEL SUELO			
		Residencial	Comercial	Industrial	Agrícola
Parámetros orgánicos					
Aceites y grasas	mg/kg	500	<2500	<4000	<4000
Benceno	mg/kg	0.08	5	5	0.03
Etilbenceno	mg/kg	0.1	20	20	0.1
Estireno	mg/kg	5	50	50	0.1
Tolueno	mg/kg	0.37	0.8	0.8	0.08
Xileno	mg/kg	2.4	11	20	0.1
PCBs	mg/kg	1.3	33	33	0.5
Clorofenoles (cada tipo)	mg/kg	0.5	5	5	0.05
Fenoles (total)	mg/kg	3.8	3.8	5	3.8
Clorinados alifáticos (cada tipo)	mg/kg	5	50	50	0.1
Hidrocarburos totales (TPH)	mg/kg	230	620	620	150
Clorobencenos (cada tipo)	mg/kg	2	10	10	0.05
Tetracloroetilenos	mg/kg	0.2	0.5	0.6	0.1
Tricloroetileno	mg/kg	3	30	30	0.1
Atrazina	mg/kg	0.005	0.005	0.005	0.005
Carbofuran	mg/kg	0.01	0.01	0.01	0.01
Alifáticos no clorinados (cada tipo)	mg/kg	-	-	-	0.3
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)					
Antraceno	mg/kg	-	-	100	0.1
Benzo(a)antraceno	mg/kg	1	1	10	0.1
Benzo(a)pireno	mg/kg	0.7	10	0.7	0.1
Benzo(b)fluoranteno	mg/kg	1	0.7	10	0.1
Benzo(k)fluoranteno	mg/kg	1	10	10	0.1
Dibenzo(a,h)antraceno	mg/kg	1	10	10	0.1
Indeno(1,2,3-cd)pireno	mg/kg	1	10	10	0.1
Fluoranteno;	mg/kg	-	10	100	0.1
Naftaleno;	mg/kg	0.6	-	22	0.1
Pireno;	mg/kg	10	22	100	0.1
Criseno;	mg/kg	-	-	100	0.1
Fenantreno;	mg/kg	5	50	50	0.1

Tomado de Ministerio del Ambiente de Ecuador, 2015, p. 16.

2.2. Biorremediación

La biorremediación se refiere al uso de microorganismos para la remediación de aguas o suelos contaminados por hidrocarburos, metales pesados u otros contaminantes químicos nocivos para la salud y medio ambiente (Tortora, Funke y Case, 2007, p. 33). Esto es posible gracias a diferentes mecanismos que los microorganismos han desarrollado para sobrevivir a estos ambientes contaminados (Di Conza y Gutkind, 2010, p. 63).

La biorremediación busca explotar aquellos microorganismos que se han adaptado para degradar contaminantes específicos, es decir que utilizan un contaminante mediante su metabolismo. El metabolismo modifica el contaminante, formando compuestos menos nocivos o incluso inocuos desde el punto de vista medio ambiental y sanitario (Maroto y Rogel, 2002, p. 297).

La biorremediación utiliza tres técnicas para la eliminación de contaminantes en suelos contaminados: la atenuación natural, la bioestimulación y el bioaumentación.

2.2.1. Atenuación natural

La atenuación natural se basa en el uso de microorganismos autóctonos en el suelo para la degradación del contaminante. Es un proceso viable cuando el suelo tiene gran cantidad de materia orgánica, pero en suelos calizos o en formaciones geológicas como acuíferos no se recomienda, porque el flujo de agua subterránea no es previsible y esto afecta directamente al movimiento del contaminante (Arrieta, 2011, pp. 1, 19).

Estudios como el de Bento, Camargo, Okeke y Frankenberger (2005, pp.1051-1052), señalan que el porcentaje de remoción de TPH's por atenuación natural depende bastante de los factores que se mencionarán en el apartado 2.5. Es así que se observa que, en la localidad 1 del estudio mencionado se alcanzó 50% de remoción de TPH's de fracción ligera por atenuación natural, comparado con

84% alcanzado por bioaumentación y un 72% alcanzado por bioestimulación. Sin embargo en la localidad 2 la remoción de TPH's de fracción ligera alcanzo un mayor porcentaje por atenuación natural (47%), que por bioaumentación (44%) o bioestimulación (35%).

2.2.2. Bioestimulación

La bioestimulación aprovecha los microorganismos degradadores autóctonos, gracias a la adición de nutrientes (como nitrógeno, fósforo, calcio, sodio, entre otros) y el control de variables físico-químicas claves (como concentración de oxígeno, humedad o temperatura) para mejorar las condiciones de crecimiento (Arrieta, 2011, p. 7) (Castillo *et al.*, 2005, p. 424).

2.2.3. Bioaumentación

El bioaumentación por otro lado involucra la adición de microorganismos degradadores alóctonos o autóctonos al suelo, de manera que el proceso de remediación ocurra en menos tiempo (Sánchez y Rodríguez, 2003, p. 13).

La adición de microorganismos no autóctonos puede afectar la dinámica del suelo debido a que muchas veces los microorganismos autóctonos y no autóctonos tienen relaciones de antagonismo (ya sea por competencia de nutrientes o espacio, antibiosis, producción de enzimas extracelulares o parasitismo) (Hernández, Bautista y Velázquez, 2007, p. 66-68), lo que influye en la tasa de crecimiento y por ende en el porcentaje de remoción de un contaminante (Muskus, Santoyo y Plata, 2013, p. 89).

2.3. Importancia y utilidad de la biorremediación

La actividad antropogénica ha desencadenado a escala mundial un problema con respecto a la contaminación del aire, el agua y los suelos. Esta cuestión se

refleja especialmente es países explotadores de recursos como metales pesados o hidrocarburos (Benavides *et al.*, 2006, pp. 82-84).

Cuando estos compuestos o elementos se encuentran en los suelos en concentraciones altas suelen tener efectos desfavorables sobre los microorganismos (Galán y Romero, 2008, p. 49) y aumentan la salinidad de los suelos dificultando el tratamiento de los mismos (Benavides *et al.*, 2006, p. 82). Cuando la contaminación ocurre en ríos y suelos los contaminantes ingresan a la cadena trófica afectando la salud de humanos y animales (Molina y Point, 2014, p. 270).

El benceno (hidrocarburo aromático) es un compuesto mutacarcinogénico, una sustancia que produce mutaciones en el material genético alterando las funciones celulares, secuencias de genes oncosupresores o secuencias de protooncogenes (induciendo el cáncer). Algunos metales pesados como el plomo son teratogénicos (sustancias que en determinadas dosis afectan al desarrollo del feto pero no a la madre) (Zuluaga, Valencia y Ortiz, 2009, pp. 34, 39).

Estos contaminantes representan una amenaza ambiental por sus efectos sobre la biodiversidad y otros recursos naturales, pero también se consideran un problema desde el punto de vista sanitario por sus efectos citotóxicos (López *et al.*, 1998, p. 27).

2.4. Hidrocarburos

Los hidrocarburos son compuestos formados por diferentes combinaciones de átomos de carbono e hidrógeno; son considerados los esqueletos fundamentales de las moléculas orgánicas (formadas por el reemplazo de los hidrógenos por otros grupos funcionales). En la industria gran parte de los productos orgánicos comerciales se derivan de los hidrocarburos (que se encuentran en el petróleo, carbón o gas natural) (Yúfera, 1994, p. 113).

La clasificación de los hidrocarburos puede basarse en la naturaleza de la molécula (alifática o aromática), la estructura de la molécula (acíclica o cíclica) o por los tipos de enlaces formados entre los átomos de carbono (simples, dobles y triples) (Gutiérrez, 1985, p. 400).

2.4.1. Hidrocarburos alifáticos

Son los hidrocarburos que reaccionan principalmente por adición de radicales libres (ocurre en los enlaces múltiples) y la sustitución homolítica de radicales libres (ocurre en otros puntos de la cadena alifática) (Thornton y Nielson, 1998, p. 469).

Pueden ser hidrocarburos de cadena abierta saturada (enlaces simples) (figura 2) o insaturada (enlaces dobles y triples) (figura 3), o hidrocarburos cíclicos (con enlaces simples, dobles o triples) (figura 4) (Gutiérrez, 1985, p. 400).

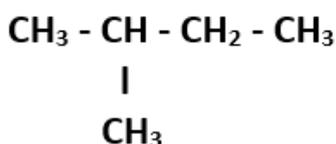


Figura 2. Molécula de isopentano.

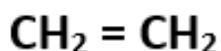


Figura 3. Molécula de eteno o etileno.

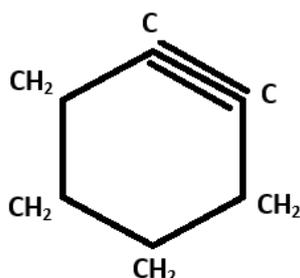


Figura 4. Molécula de ciclohexino.

2.4.2. Hidrocarburos aromáticos

Los hidrocarburos aromáticos son moléculas que forman uno o varios anillos, la molécula base de estos compuestos es el benceno (formado por un anillo resonante de 6 carbonos y 6 hidrógenos). A diferencia de un ciclohexano (6 carbonos y 12 hidrógenos), el benceno es una molécula mucho más estable no por la disposición de sus electrones sino por el tipo de enlaces que los mismos forman (Thornton y Neilson, 1998, p. 472).

La resonancia es una característica importante de los anillos aromáticos (anillos no saturados), el benceno por ejemplo tiene tres enlaces simples y tres enlaces dobles alternativamente ubicados entre los 6 átomos de carbono. Estos enlaces pueden encontrarse en dos configuraciones (figura 5), es decir los dobles enlaces pueden estar entre los átomos 1 y 2, 3 y 4, 5 y 6 o entre los átomos 2 y 3, 4 y 5, 6 y 1. El benceno toma las dos configuraciones alternando rápidamente entre ellas, a lo que se conoce como resonancia (Aguilar y de la Rubia, 2004, p. 314). Los hidrocarburos aromáticos tienden a reaccionar por sustitución heterolítica (Thornton y Nielson, 1998, p. 472)

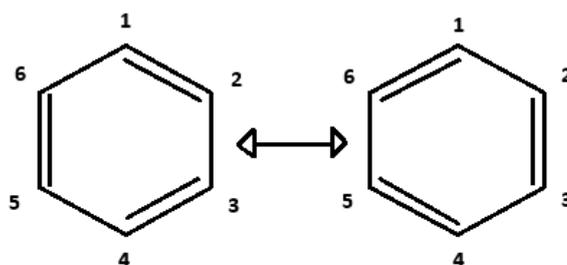


Figura 5. Configuraciones del benceno

Tomado de: Macy, 1992, p. 189.

Este tipo de hidrocarburos se puede clasificar en dos subtipos por el número de anillos que tienen, en monocíclicos (Benceno, Tolueno, etilbenceno y xileno, etc.) y policíclicos (naftaleno, fenantreno, antraceno, etc.) (González, 1991, p. 71).

2.4.3. Asfaltenos y resinas

Estos compuestos corresponden a las fracciones más pesadas, los asfaltenos están formados por una acumulación de láminas poliaromáticas condensadas, unidas por cadenas saturadas (Wauquier, 2004, p. 13) (figura 6).

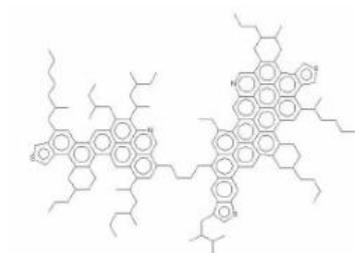


Figura 6. Estructura propuesta de un asfalteno, analizado por resonancia magnética nuclear

Tomado de: Navarro, Álvarez, Grosso y Navarro, 2004, p. 64.

Las resinas tienen una estructura similar (figura 7), pero con un menor tamaño y polaridad y una proporción mayor de cadenas alquil aromáticas (Lluch, 2011, p. 338).

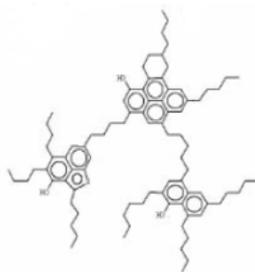


Figura 7. Estructura propuesta de una resina, analizada por resonancia magnética nuclear

Tomado de: Navarro *et al.*, 2004, p. 64.

2.5. Factores que influyen en la biorremediación

La biorremediación se ve condicionada por 3 tipos de factores: en relación al contaminante, en relación a los microorganismos y en relación al medio ambiente.

2.5.1. Factores en relación al contaminante

2.5.1.1. Constitución química

La constitución química, es decir el tipo de contaminantes que va a tratarse es un importante factor que afecta a la biorremediación. Algunos ejemplos de los contaminante más comunes son los hidrocarburos (de distintos tipos), metales pesados, compuestos organoclorados, nitroaromáticos, fenoles, etc (Velasco y Volke, 2002, p. 13).

Es importante conocer el contaminante a tratar, para conocer qué estrategia de remediación usar. Otros factores que afectan al proceso de biorremediación (se verán a continuación) son propiedades físico-químicas que vienen dadas por la constitución química del contaminante (Velasco y Volke, 2002, p. 14).

2.5.1.2. Biodegradabilidad

La biodegradabilidad del contaminante es una importante propiedad a considerar, esta depende de la estructura y composición molecular del contaminante. Las sustancias de menor peso molecular son más fáciles de degradar, así mismo las que tengan pocas ramificaciones y pocos anillos (Van Leeuwen y Hermens, 1995, p. 82). Algunos grupos funcionales como el alcohol favorecen a la biodegradabilidad a diferencia de otros como el cloro (Van Leeuwen y Hermens, 1995, p. 82).

2.5.1.3. Estado físico

El estado físico es otro factor que influye en la disponibilidad del contaminante para los microorganismos. Algunos líquidos no son miscibles en agua, los sólidos presentan movilidad y superficie de contacto escasa y los gases tienden a escapar hacia la atmósfera (Gómez, 2003, p. 9).

2.5.1.4. Solubilidad

Así mismo la solubilidad en agua es otro factor importante, los contaminantes deberán disolverse en agua para poder estar biodisponibles para los microorganismos o al menos emulsionar con la ayuda de surfactantes (Castillo *et al.*, 2005, p. 441). Este factor viene condicionado por la estructura molecular del contaminante (Velasco y Volke, 2002, p. 14).

2.5.1.5. Volatilidad

La volatilidad también influye en el proceso de biorremediación, debido a que se pierden por volatilización las fracciones más ligeras del contaminante (Velasco y Volke, 2002, p. 14), este factor depende de la estructura molecular, resultando las sustancias de menor peso molecular más volátiles que aquellas de alto peso molecular (Porta, Lopez-Acevedo y Poch, 2014, p. 369).

2.5.1.6. Concentración

La concentración del contaminante también es un factor condicionante, elevadas concentraciones pueden resultar tóxicas o inhibitorias para los microorganismos (Velasco y Volke, 2002, p. 14). Se debe tener en cuenta la volatilidad de las fracciones más ligeras y el tiempo transcurrido desde el derrame, ya que estos compuestos se pierden por volatilización y por ende se reduce su concentración (Gómez, 2003, p. 13).

2.5.2. Factores en relación a los microorganismos

2.5.2.1. Tipos de microorganismos

Los microorganismos degradadores son los que hidrolizan una molécula contaminante determinada en metabolitos o moléculas más pequeñas, principalmente pueden ser hongos o bacterias (Velasco y Volke, 2002, p. 31). Las bacterias al tener menor tamaño que los hongos tienen una mayor superficie de contacto (figura 8) y por ende mayor facilidad para crecer en un medio con pocos nutrientes (Engleberg, DiRita y Dermody, 2013, p. 33).

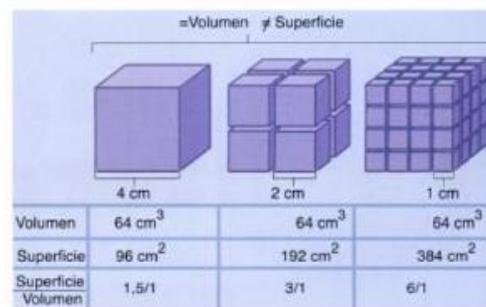


Figura 8. Relación entre el volumen y la superficie

Tomado de: Curtis, Schnek, Massarini y Barnes, 2008, p. 34.

Las bacterias también detectan sustancias nutritivas con más facilidad, esta habilidad reside en sus membranas (Saier, 1979, p. 169). En los eucariotes (hongos) esta información se procesa en el interior de la célula (Boucias, Lietze y Teal, 2012, p. 306).

2.5.2.2. Rutas metabólicas

No todos los microorganismos son capaces de degradar contaminantes, esta capacidad viene dada por las enzimas, sin embargo solo se expresan dependiendo del ambiente (siempre y cuando estos genes estén presentes en el reservorio genético de las poblaciones microbianas o se hayan adquirido por mutaciones) (Maier *et al.*, 2009, p. 394). Normalmente para la degradación de

mezclas complejas como los hidrocarburos, es necesario contar con varios microorganismos (Sánchez y Rodríguez, 2003, p. 15). Este grupo de microorganismos se denomina consorcio y cada uno de los microorganismos aporta con enzimas que son necesarias para la degradación del contaminante (Maier *et al.*, p. 53).

Los consorcios son de gran importancia por las relaciones de cooperación que pueden establecer los microorganismos que los conforman; la síntesis de factores de crecimiento, la degradación de sustancias tóxicas o el cometabolismo les dan ventajas de crecimiento frente a otras especies (Magni, García-Quitans, Martín, de Mendoza y López, 2008, p. 10-11).

El cometabolismo consiste en la degradación de dos sustratos, uno que le sirve al microorganismo como fuente de energía (sustrato primario) y otro que lo degrada sin ningún beneficio (sustrato secundario). Sin embargo el producto de esta transformación le sirve como fuente de energía a otros microorganismos (figura 9) (Anaya, 2003, p. 111). El cometabolismo puede ocurrir estrictamente en presencia del sustrato primario o sin él (García y Peralta, 2008, p. 1). La sintrofia o sintrofismo es la actividad concertada de diferentes microorganismos sobre un mismo sustrato, con el fin de degradarlo (Sánchez y Rodríguez, 2003, p. 15).

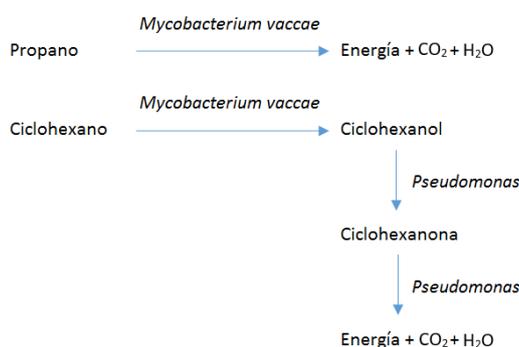


Figura 9. Ejemplo de cometabolismo de *Mycobacterium vaccae* (que metaboliza propano como sustrato primario y ciclohexano como sustrato secundario).

Tomado de: Anaya, 2003, p. 111.

La degradación de hidrocarburos alifáticos ocurre gracias a las enzimas monooxigenasa, alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa y las enzimas que participan en la β -oxidación de ácidos grasos (De Lorenzo y Rojo, 1994, p. 340). Todas las enzimas en conjunto llevan a cabo la oxidación sucesiva del compuesto hasta Acetil CoA (figura 10) (Castillo *et al.*, 2005, p. 429).

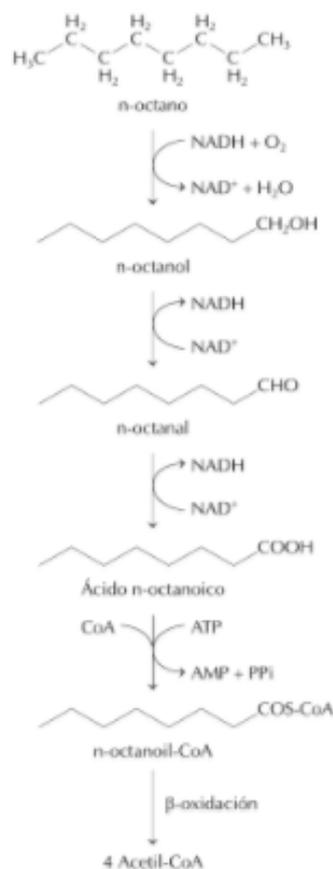


Figura 10. Degradación aeróbica del n-octano

Tomado de: Castillo *et al.*, 2005, p. 429.

La degradación anaerobia de compuestos alifáticos implica algunas reacciones que incluyen oxidaciones, deshidrataciones e hidrataciones en las que las bacterias suelen usar fumarato como aceptor de electrones (figura 11) (Castillo *et al.*, 2005, p. 429),

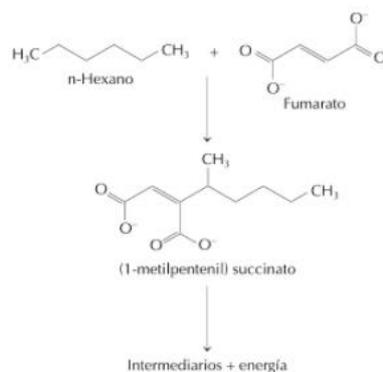


Figura 11. Degradación anaeróbica del n-hexano

Tomado de: Castillo *et al.*, 2005, p. 430.

La degradación de hidrocarburos aromáticos ocurre por la oxidación de estos compuestos gracias a las enzimas monooxigenasas y dioxigenasas (Cerniglia, 1992, pp. 229, 232). Para bacterias, existen dos posibles rutas para la degradación de hidrocarburos aromáticos. En el caso bacterias aerobias ocurre la hidroxilación del anillo por acción de las enzimas dioxigenasas (formando cis-dihidrodiol), posteriormente los cis-dihidrodiol son dehidrogenados para formar compuestos intermediarios dihidroxilados (hasta formar catecol), el catecol puede ser mineralizado mediante la fisión del anillo (figura 12) (Bamforth y Singleton, 2005, p. 726).

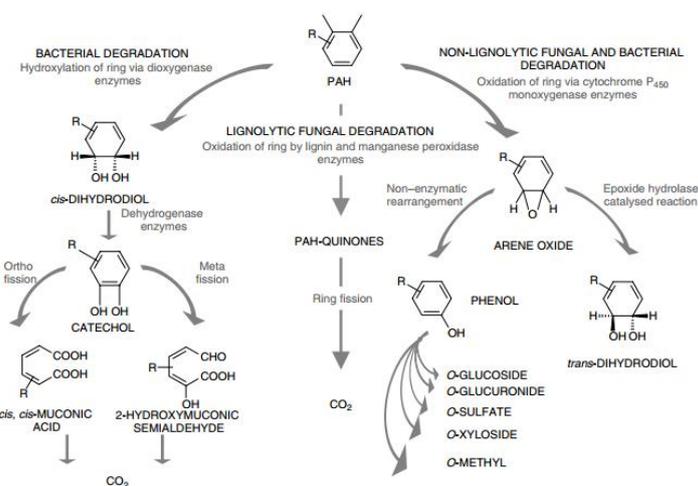


Figura 12. Ruta metabólica de degradación de compuestos aromáticos policíclicos.

Tomado de: Bamforth y Singleton, 2005, p. 726.

Para la degradación anaerobia de compuestos policíclicos aromáticos se observa que ocurren reacciones de carboxilación e hidrogenación sucesiva sobre los anillos con el fin de mineralizar el compuesto (figura 13) (Bamforth y Singleton, 2005, p. 728-729).

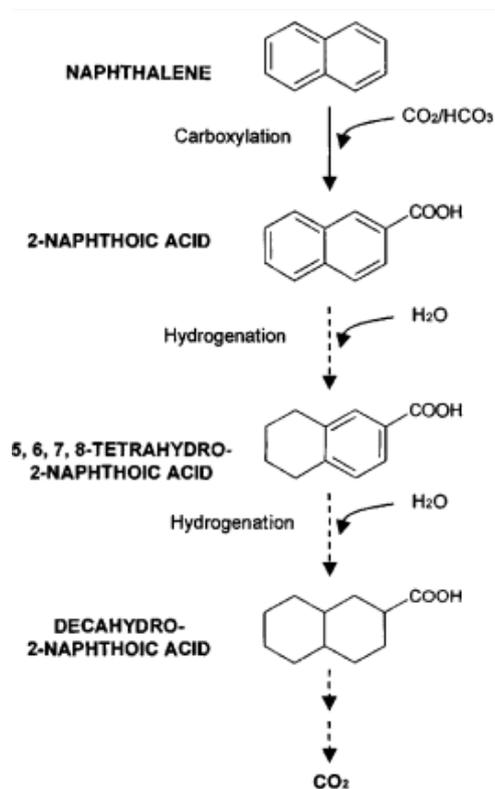


Figura 13. Degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) por la ruta anaeróbica

Tomado de: Bamforth y Singleton, 2005, p. 729.

Se conoce poco sobre la degradación de resinas y alfaltenos, en el pasado eran compuestos que se consideraban refractarios a la degradación por sus estructuras complejas (Venosa y Zhu, 2003, p. 164). Sin embargo estudios como el de Bertrand, Rambeloarisoa, Rontani, Giusti y Mattei (1983, p. 567) han demostrado que es posible degradar asfaltenos con la ayuda de consorcios bacterianos.

2.5.2.3. Contacto microorganismo-sustrato

Se debe tener en cuenta el contacto microorganismo-sustrato, ya sea a través del paso del contaminante por la membrana o por la liberación de enzimas extracelulares que degraden parcialmente el contaminante para que ingrese a la célula (Alexander, 1999, p. 123), el paso a través de la membrana puede ocurrir por transporte pasivo o activo (Campbell y Reece, 2007, p. 130).

La pared celular es rígida y la membrana celular es de origen lipídico, por lo que es necesario que la sustancia se encuentre disuelta para pasar por la membrana o las proteínas transmembrana y debe tener el tamaño adecuado para ingresar al interior de la célula (Maier *et al.*, 2009, pp. 13-14). La membrana es hidrófoba por lo que es poco permeable a sustancias polares (Campbell y Reece, 2007, p. 130).

2.5.2.4. Rendimiento metabólico

El rendimiento del metabolismo es otro factor a tener en cuenta, el metabolismo consiste en una serie de reacciones bioquímicas complejas que pueden estar destinadas a la síntesis de biomasa (anabolismo) o a la mineralización del sustrato con producción de energía (ATP), poder reductor (NAPDH), agua y dióxido de carbono (catabolismo) (Engelkirk, Duben-Engelkirk y Wilson, 2011, p. 387). El ATP y NAPDH son necesarios para la síntesis de biomasa (Nielsen, 2012, p. 47).

El rendimiento, ya sea para el producto (minerales y materia orgánica persistente) o para la biomasa viene dado por la naturaleza del sustrato, por las condiciones ambientales y por los microorganismos que participen (Walworth y Ferguson, 2008, p. 156). En un proceso de biorremediación se busca que una vez que se alcance la cantidad adecuada de biomasa se produzca la mineralización máxima (degradación total del contaminante) (Barrios, 2011, p. 70).

La mineralización no siempre se logra mediante el catabolismo de un solo microorganismo, sino que es necesario de otro o varios microorganismos que degraden el metabolito intermedio, dado que estos metabolitos pueden resultar incluso más tóxicos que el contaminante original (Sánchez y Rodríguez, 2003, p. 15).

2.5.2.5. Crecimiento

En este contexto, el crecimiento microbiano es de gran importancia, debido a que la degradación de un contaminante es función del número de microorganismos degradadores presentes en el medio (Wong *et al.*, 1997, p. 137). El crecimiento está en dependencia de factores abióticos (pH, temperatura, humedad y otros) y bióticos (relaciones sintróficas o de competencia con otros microorganismos) (Alexander, 1999, pp. 270, 282, 287) (Curtis *et al.*, 2008, p. 473).

Los microorganismos pueden ocupar varios sustratos como fuente de energía para aumentar la biomasa, sin embargo ocupan inicialmente los que son más rentables energéticamente (brindan ventajas de crecimiento) y luego consumen los menos rentables (Sigee, 2005, p. 307). Al exponerse a las células a nuevas sustancias es necesario que se adapten y empiecen a expresar las enzimas necesarias para degradarlas, esto ocurre en la fase de latencia (Maier *et al.*, 2009, p. 38). La fase de latencia para hidrocarburos dura alrededor de 5 días, siempre y cuando existan las condiciones idóneas en el suelo y cuando los microorganismos tengan capacidad degradadora (Acuña, Tonín, Díaz, Pucci y Pucci, 2012, p. 110).

2.5.2.6. Modificaciones genéticas

En caso de no contar con la capacidad metabólica para degradar un contaminante, en las células pueden ocurrir cambios genéticos que doten a los

microorganismos de nuevas funciones metabólicas. En el caso de las bacterias los mecanismos más comunes son la conjugación y la transformación, en el que las células transfieren información genética de manera horizontal a través de distintos elementos transponibles (Maier *et al.*, 2009, p. 350).

2.5.2.7. Grupos de microorganismos

Diferentes grupos de microorganismos son otro factor que influye en la biorremediación, los quimioheterótrofos (consumen sustancias orgánicas como fuente de carbono) son importantes para la degradación de contaminantes orgánicos. Las bacterias tienen gran importancia en la degradación de contaminantes en aguas, sin embargo en la degradación de hidrocarburos en suelos los hongos y bacterias tienen un rol similar (Wong *et al.*, 1997, p. 144).

Los hongos son descomponedores de materia vegetal y muchos hidrocarburos son parecidos estructuralmente a la materia orgánica de origen vegetal (Maier *et al.*, 2009, p. 74). Gracias a la formación de hifas, los hongos pueden extenderse largas distancias. Esto les permite dispersarse hasta sitios no contaminados para consumir agua y pueden ocupar los contaminantes como fuente de carbono desde otro sitio (Finlay, Lindahl y Taylor, 2008, p. 204).

2.5.2.8. Biosurfactantes

La producción de sustancias surfactantes por parte de algunos microorganismos es importante, ya que emulsionan contaminantes no miscibles en agua, aumentando su solubilidad y por ende su biodisponibilidad y degradación (Castillo *et al.*, 2005, p. 441).

2.5.3. Factores en relación al medio ambiente

Para llevar a cabo la biorremediación también son importantes las características físicoquímicas del medio y así mismo las condiciones ambientales, los dos

factores influyen sobre el estado y distribución de contaminantes y microorganismos.

2.5.3.1. Composición y estructura del suelo

La composición y propiedades del suelo como la granulometría (textura), la composición química y su estructura influyen en la permeabilidad del suelo, la retención de agua y la sorción de contaminantes.

El tamaño de las partículas que conforman el suelo afecta directamente al tamaño de poros que se forman en el mismo. Los poros que se forman entre las partículas se llaman interagregados e incluso existen poros dentro de las mismas partículas a los que se les llaman intraagregados (figura 14). Suelos con partículas pequeñas como los suelos arcillosos, forman poros muy pequeños que retienen agua o sustratos no biodisponibles (Van Leeuwen y Hermens, 1995, pp. 83, 211). Es decir que los microorganismos que son más grandes que el poro formado no pueden acceder al agua o sustratos que se encuentra dentro de ese poro (figura 15) (Maier *et al.*, 2009, p. 61).

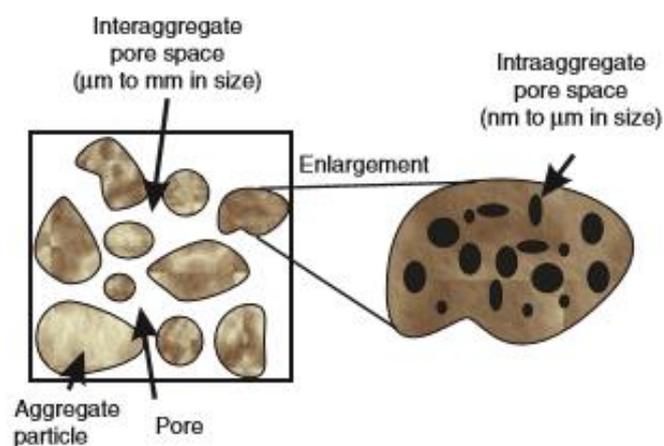


Figura 14. Tipos de poros existentes en el suelo

Tomado de: Maier *et al.*, 2009, p. 61.

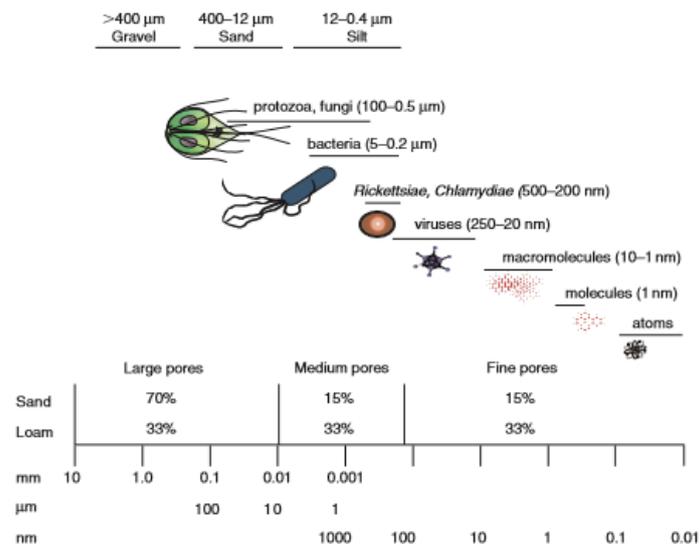


Figura 15. Relación entre el tamaño de poro y tamaño de diferentes organismos y moléculas presentes en el suelo

Tomado de: Maier *et al.*, 2009, p. 62.

La composición química del suelo es otro factor importante a considerar, las partículas que forman el suelo tienen una carga negativa (debido a que son formadas por materia orgánica y minerales con esa carga) al igual que los microorganismos. Esto quiere decir que los microorganismos y las partículas de suelo se deben repeler, sin embargo esto no ocurre gracias a la capacidad de intercambio catiónico. Este proceso permite que los iones con carga positiva (coloides) presentes en el suelo se unan a las partículas de suelo, logrando que las partículas tengan una carga neutra y puedan tener contacto con los microorganismos (figura 16) (Maier *et al.*, 2009, p. 65).

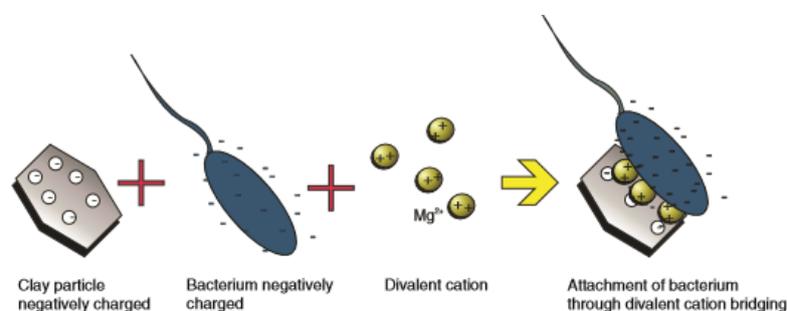


Figura 16. Funcionamiento de la capacidad de intercambio catiónico

Tomado de: Maier *et al.*, 2009, p. 65.

2.5.3.2. Temperatura

La temperatura alta eleva la tasa metabólica hasta un punto máximo que depende de los diferentes tipos de microorganismos (psicrófilos, termófilos o mesófilos). Los microorganismos por lo tanto necesitan de una temperatura óptima para alcanzar su mayor tasa de crecimiento (figura 17), aunque también pueden adaptarse por varios mecanismos (Madigan, Martinko y Parker, 2004, p. 151-157). A mayor temperatura aumenta la solubilidad, la volatilidad (la presión también afecta esta propiedad) y disminuye la viscosidad de los contaminantes (Muñoz, Álvarez y Asedegbega, 2016, apartado 5.5).

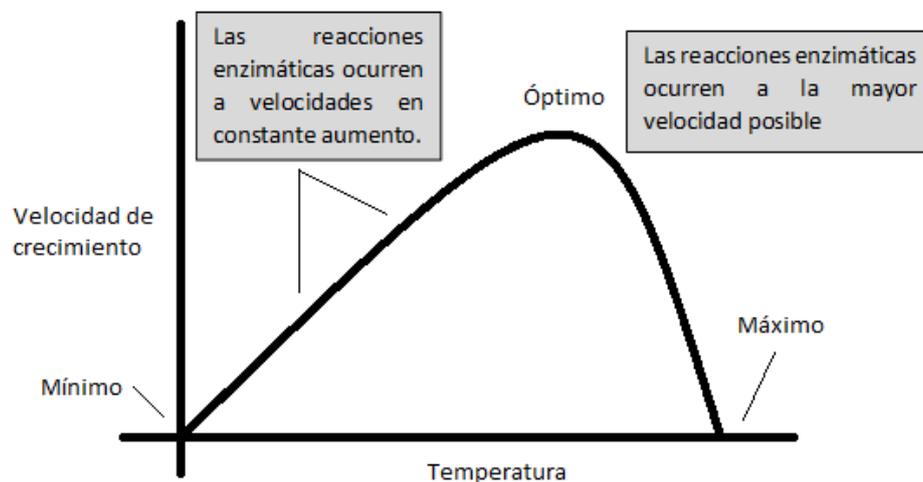


Figura 17. Efectos de la temperatura en la velocidad de crecimiento

Tomado de: Madigan *et al.*, 2004, p. 151.

2.5.3.3. pH

El pH influye de igual manera en el crecimiento, observándose que un pH cercano al neutro es mejor para las bacterias y que los hongos resisten mejor el pH ligeramente ácido (Taiz y Zeiger, 2006, p. 141), en valores muy extremos la mayoría de proteínas se desnaturaliza (figura 18) (Manahan, 2007, p. 114). También se ve afectada la disponibilidad de nutrientes (mayor en medios ácidos),

el pH incluso puede modificar las propiedades químicas de un contaminante con propiedades ácido-base y afectar su solubilidad (Maier *et al.*, 2009, p. 65).

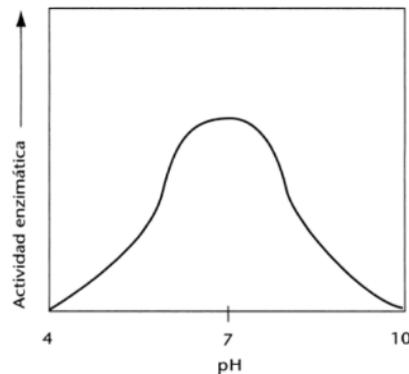


Figura 18. Actividad enzimática y por ende desarrollo bacteriano como función del pH

Tomado de: Manahan, 2007, p. 114.

2.5.3.4. Humedad

La humedad es importante ya que todos los organismos vivos necesitan agua, la cantidad de agua existente en el suelo no es el verdadero factor limitante, sino la cantidad de agua disponible (Maier *et al.*, 2009, p. 399). Es así que se analizan factores como el potencial hídrico o la actividad de agua para conocer qué cantidad de agua está retenida en superficies y qué cantidad de agua está libre. Cantidades excesivas de agua son perjudiciales, debido a que desplazan el oxígeno (Velasco y Volke, 2002, p. 18).

Una propiedad bien estudiada es el potencial suelo-agua, en la superficie de las partículas del suelo se encuentra adherida una capa de agua muy fina (angstroms), que se une a estas partículas por fuerzas superficiales (sería necesaria una presión muy alta para separar el agua de las partículas de suelo). Cercana a esta fina capa se encuentra más agua, que se mueve por fuerzas capilares y que es más biodisponible. Por último el agua que se encuentra dentro de los poros grandes (está más alejada de las partículas) se mueve por fuerzas gravitacionales y es más biodisponible aún (figura 19) (Maier *et al.*, 2009, p. 68)

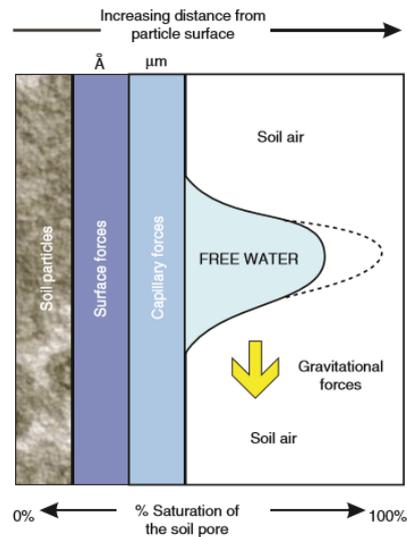


Figura 19. Funcionamiento del potencial suelo-agua

Tomado de: Maier *et al.*, 2009, p. 68.

En suelos más húmedos los cationes alcalinos se lixivian (separan del suelo), por lo que hay mayor cantidad de materia orgánica que en suelos áridos (donde el agua se evapora y aumenta la cantidad de sales y por ende la alcalinidad del suelo) (Maier *et al.*, 2009, pp. 65-66).

2.5.3.5. Nutrientes

Los nutrientes como el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, entre otros deben encontrarse en el medio en proporciones adecuadas, al ocurrir una contaminación por hidrocarburos se aumenta la proporción de carbono, por ello la importancia de aumentar la proporción de otros nutrientes (bioestimulación) (Flathman, Jerger y Exner, 1994, p. 312).

Las proporciones ideales de los nutrientes más importantes (carbono, nitrógeno y fósforo o C:N:P) se plantean de maneras diferentes en la bibliografía, una de las más aceptadas es 100:10:1 (Kuo, 2014, p. 193), sin embargo estas proporciones varían según las condiciones de cada ecosistema y según la predominancia de hongos y bacterias (Levin, 2009, p. 378). A mayor

concentración de sales aumenta la salinidad del suelo y el pH se hace más alcalino, pudiendo afectar a la estabilidad de las proteínas y el crecimiento de microorganismos (Flores *et al.*, 1996, p. 46) (Manahan, 2007, p. 114).

Algunos metales funcionan como cofactores enzimáticos, por lo que su presencia en el suelo es de gran importancia para que los microorganismos puedan llevar a cabo las diferentes reacciones metabólicas con el fin de reproducirse y eliminar contaminantes (Berg, Tymoczko y Stryer, 2008, p. 207).

2.5.3.6. Aceptores finales de electrones

La degradación de los contaminantes ocurre en su mayoría por reacciones redox, donde distintos compuestos actúan como aceptores finales de electrones. En reacciones aerobias este compuesto es el oxígeno, el mismo actúa como el reactivo limitante de la reacción y la biorremediación resulta un problema especialmente en suelos arcillosos donde los poros son pequeños y existe menor cantidad de oxígeno (Wong *et al.*, 1997, p. 150).

En reacciones anaerobias los principales aceptores finales de electrones son nitratos, sulfatos, hierro o incluso ocurre fermentación (Velasco y Volke, 2002, p. 44) (Wong *et al.*, 1997, pp. 146-147).

2.6. Bioaumentación en suelos contaminados

El bioaumentación es la técnica de biorremediación que adiciona microorganismos degradadores de un contaminante específico a un suelo, con el fin de aumentar la cantidad de microorganismos degradadores y por ende la tasa de degradación de un contaminante.

La adición de microorganismos al suelo se ha practicado desde hace décadas en el campo agrícola con el fin de controlar plagas, proporcionar hormonas vegetales, mejorar la estructura del suelo o suministrar nutrientes. Sin embargo

en la actualidad el bioaumentación es un enfoque discutido. Autores como Lee y Merlin (1999, p. 162) o Van Hamme *et al.* (2003, p. 523) concluyeron mediante sus investigaciones que la adición de cultivos comerciales no aumenta de manera significativa la velocidad de degradación de los contaminantes comparada a la bioestimulación.

Cuando se añaden poblaciones alóctonas debe aplicarse una estrategia *ex situ*, debido a que las poblaciones autóctonas están adaptadas de mejor manera a las condiciones ambientales y compiten con la población inoculada. Para llevar a cabo esta técnica con enfoque *in situ* se debe caracterizar el suelo biológica y fisicoquímicamente con el fin de utilizar un microorganismo alóctono que tenga las mayores ventajas de crecimiento.

Estudios como el de Bento *et al.* (2005, pp.1051-1052), indican que el porcentaje de remoción de fracciones ligeras de TPH's con bioaumentación puede alcanzar hasta el 68%, comparado con el 59% alcanzado por bioestimulación. Las fracciones pesadas de TPH's fueron removidas en 37% por bioaumentación y 35% por bioestimulación.

Existen también estudios como el de Ruiz, Álvarez, González-Ruiz y Torres (2011, p. 1) que demuestran la viabilidad del uso microorganismos transgénicos para la remediación de mercurio en matrices líquidas. Sin embargo, las leyes ecuatorianas prohíben el uso de técnicas que utilicen organismos genéticamente modificados. Por tal razón el empleo de microorganismos que se han adaptado naturalmente a la contaminación es la mejor alternativa para aplicabilidad en el país.

2.7. Bioestimulación en suelos contaminados

La bioestimulación se refiere a la creación de las condiciones idóneas para que la biorremediación ocurra y es un enfoque que se basa en la adición de

elementos o compuestos que estimule el crecimiento de microorganismos autóctonos degradadores.

Los factores a regular son el oxígeno, el agua y los nutrientes; regulándolos de manera adecuada se puede aumentar de manera considerable el crecimiento microbiano, mejorando la eliminación del contaminante.

El estudio de Muskus *et al.* (2012, p. 83) comparó las eficiencias de remoción de diésel usando aireación, bioaumento (consorcio alóctono) y atenuación natural; se demostró que el mayor porcentaje de remoción se alcanza solo con aireación (97%), e incluso al combinar aireación con bioaumento usando un consorcio alóctono se obtiene un porcentaje de remoción menor (75%).

Por otro lado, Samanez (2008, p. 6, 33) demostró que existe mayor tasa de eliminación del contaminante al utilizar fertilizantes combinados con bacterias alóctonas y autóctonas (71% y 67%), comparado a cuando no se utilizan fertilizantes (62% y 52%).

Estudios como el de Vallejo, Salgado y Roldán (2005, pp. 67) o García, Roldán y Garzón (2011, p. 195) no demostraron diferencias significativas entre la biorremediación por bioestimulación y la atenuación natural.

2.8. Medios selectivos y diferenciales

El estudio de las características de los diferentes microorganismos requiere que los mismos se encuentren aislados, es decir en cultivo puro. Gracias a los conocimientos sobre nutrición bacteriana es posible desarrollar medios que favorezcan el crecimiento de determinados microorganismos sobre otros o incluso que el crecimiento de microorganismos no deseados se vea inhibido (Rodríguez Gamboa, Hernández y García, 2005, p. 133).

Medios selectivos utilizan sustancias inhibidoras, fuentes de carbono específicas o ambas; de manera que solo los microorganismos que puedan sobrevivir a las sustancias inhibidoras o solo aquellos microorganismos que puedan consumir una determinada sustancia como fuente de carbono crezcan en el medio de cultivo (Rodríguez *et al.*, 2005, p. 134).

Los medios diferenciales utilizan sustancias que pueden ser metabolizadas por algunos microorganismos y un indicador que pueda evidenciar su metabolismo. De manera que varios microorganismos pueden crecer en el medio, pero solo algunos demuestran ser metabolizadores de una determinada sustancia gracias a un indicador (Rodríguez *et al.*, 2005, p. 134).

Incluso en algunos medios se utilizan ambas propiedades, a estos medios se les denomina selectivos y diferenciales. Algunos ejemplos de este tipo de medios son el agar MacConkey o el agar SS, que permiten aislar enterobacterias Gram negativas y gracias al cambio de color en la colonias delimitar los géneros a los que la bacteria podría pertenecer (Rodríguez *et al.*, 2005, p. 134).

2.9. Aislamiento de microorganismos

Los medios selectivos y diferenciales por sí solos no son suficientes para llevar a cabo el aislamiento de microorganismos, simplemente funcionan para reducir significativamente las poblaciones microbiológicas de la muestra original y para determinar pocas características de su metabolismo (Forbes, Sahm y Weissfeld, 2009, p. 103).

Para obtener un cultivo puro y llevar a cabo la caracterización de una población microbiológica es necesario recurrir a otros métodos. Inicialmente es necesaria la observación de la forma y color de las colonias (Forbes *et al.*, 2009, p. 103). Se selecciona una sola colonia y se realiza el estriado en placa, la diseminación en superficie o la siembra de diluciones seriadas (Negroni, 2009, p. 557).

La técnica más ampliamente utilizada es el estriado en placa (Tortora *et al.*, 2007, p. 173), su principio se basa en el agotamiento progresivo del inóculo al realizar varias estrías sobre un medio sólido, Las estrías consecutivas solo tienen un punto de contacto con la estría anterior y un punto de contacto con la estría siguiente; es así que las últimas estrías tendrán la menor carga microbiana y por ende un cultivo puro (Negroni, 2009, p. 557).

La diseminación en superficie utiliza una gota del cultivo diluido que se extiende en la placa, obteniendo por la pequeña cantidad del inóculo pocas colonias pequeñas bien separadas (Negroni, 2009, p. 557).

La dilución seriada utiliza un poco del inóculo diluido, que posteriormente pasará por diluciones sucesivas, reduciendo la carga microbiana. La última dilución (el número de diluciones dependerá de la cantidad de inóculo inicialmente diluido) será sembrada en placa, observando el crecimiento de pocas colonias, pequeñas y separadas (Negroni, 2009, p. 557).

2.10. Géneros de importancia en la degradación de hidrocarburos

La bacteria *Pseudomonas* resulta un género de especial interés en biotecnología ambiental, principalmente por algunas propiedades metabólicas como denitrificación, degradación de compuestos aromáticos y fijación de nitrógeno. Muchas cepas han demostrado tener una capacidad natural para transformarse, se encuentran ampliamente distribuidas en varios ecosistemas y ocupando varios nichos ecológicos (Lalucat, Bennasar, Bosch, García-Valdés y Palleroni, 2006, p. 511).

Estas bacterias no suelen crecer en un pH inferior a 4.5; tienen un metabolismo respiratorio, siendo el oxígeno el aceptor final de electrones, sin embargo pueden usar nitrato como aceptor alternativo (Lalucat *et al.*, 2006, p. 514).

El cometabolismo o mineralización de sustratos antropogénicos o xenobióticos hace que reciban especial atención para aplicaciones biotecnológicas (Lalucat *et al.*, 2006, p. 528).

Varias especies del género *Pseudomonas* son degradadoras de petróleo, hidrocarburos alifáticos, derivados del petróleo e hidrocarburos aromáticos (Lalucat *et al.*, 2006, p. 531). Otros géneros bacterianos capaces de degradar petróleo son *Alcanivorax* sp., *Rhodococcus* sp. y *Norcadia* spp. (Santisi *et al.*, 2015, p. 377) (Leahy y Colwell, 1970, p. 308)

La degradación de hidrocarburos aromáticos es de especial interés, debido a que estos compuestos son muy persistentes en el medio ambiente por su estabilidad termodinámica, la oxidación de estos compuestos se da gracias a las enzimas monooxigenasas y dioxigenasas (Cerniglia, 1992, pp. 229, 232). Algunos microorganismos que presentan estas enzimas y que tienen un rol importante en la remediación de hidrocarburos aromáticos son *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., algunas especies de *Alcaligenes*, *Bacillus cereus*, *Moraxella* sp., *Corynebacterium* sp., *Flavobacterium* sp., entre otros (Cerniglia, 1992, p. 354).

3. Diseño del plan experimental

Al tratarse de un estudio ambiental, se obtuvieron muestras de manera aleatoria de suelo contaminado con petróleo. En la fase de laboratorio se utilizó un diseño complementario al azar, donde las unidades experimentales tuvieron un arreglo aleatorio (figura 20).

C1D3	C1D1	C2D1	C2D2
C1D4	C2D2	C2D3	C1D1
C2D1	C1D3	C2D4	C2D3
C2D4	C1D2	C1D4	C1D2

Figura 20. Unidades experimentales que corresponden la aplicación de los tratamientos (distintas combinaciones de concentración de petróleo y localidad) en condición de aleatoriedad.

La variable independiente en este estudio fue la concentración de petróleo en el medio y la localidad, mientras que la variable dependiente se refirió a la cantidad de UFC/g. Todas las unidades experimentales fueron incubadas bajo las mismas condiciones.

Para la variable concentración de petróleo se realizaron 2 repeticiones en cada localidad, obteniendo un total de 8 repeticiones para cada concentración. Para la variable localidad se obtuvieron 4 repeticiones (2 de cada concentración) (tabla 3).

Tabla 3.

Tratamientos aplicados a las unidades experimentales

Localidad	Concentración	Concentración
	Petróleo 0.5%	Petróleo 0.7%
1	Rep 1	Rep 1
	Rep 2	Rep 2
2	Rep 1	Rep 1
	Rep 2	Rep 2
3	Rep 1	Rep 1
	Rep 2	Rep 2
4	Rep 1	Rep 1
	Rep 2	Rep 2

3.1. Diagrama de flujo

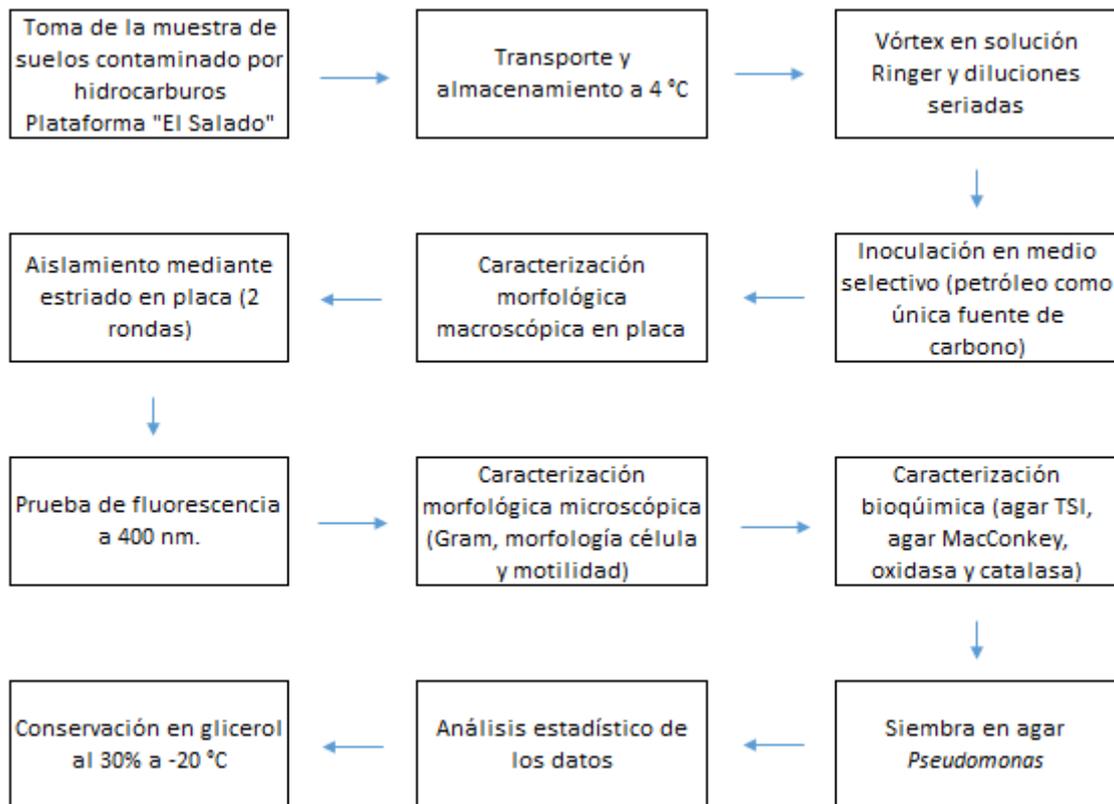


Figura 21. Diagrama de flujo para el proceso de selección, aislamiento y caracterización de las cepas bacterianas degradadoras de hidrocarburos.

4. Procedimientos

4.1. Determinación de la población y muestra

El muestreo se realizó en la plataforma de tratamiento del Departamento de Restauración Ambiental "El Salado" (figura 22) (Anexo 1 – Anexo 12). Se tomó 200 g de suelo de 4 biopilas con suelo contaminado de distintas localidades (kilómetro 2 y kilómetro 14 del Oleoducto San Miguel Lago Agrio y kilómetro 105 y kilómetro 110 del Sistema de Oleoductos Transecuatoriano).

No se homogenizó el suelo antes de la toma de muestra debido a que las biopilas son removidas con regularidad (para aumentar la biodisponibilidad de oxígeno). Las muestras fueron tomadas en paquetes de papel aluminio y fundas Ziploc estériles y transportadas en una nevera portátil a 4°C hasta su procesamiento (Echeverri, Manjarrez y Cabrera, 2010, p. 79). Se recomienda que el procesamiento de las muestras ocurra preferiblemente antes de los 14 días después de la toma de muestra (Ministerio del Ambiente de Perú, 2014, p. 22).



Figura 22. Localización de la plataforma de tratamiento “El Salado”.

Adaptado de: Google Maps, 2017.

4.2. Procedimientos para obtención de datos

4.2.1. Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos

4.2.1.1. Preparación de las muestras

Para obtener la primera dilución se pesaron 2 g de suelo que fueron homogenizados con 8 mL de solución Ringer (cloruro de calcio 0.12 g/L, cloruro de potasio 0.105 g/L, bicarbonato de sodio 0.05 g/L y cloruro de calcio 2.25 g/L) (Sigma Aldrich, 2017, p. 1) utilizando vórtex a la velocidad máxima durante 1

minuto por muestra (Arrieta *et al.*, 2012, p. 31).

4.2.1.2. Diluciones

Se realizaron diluciones seriadas para cada muestra hasta la dilución 10^{-5} o $1:10^5$ (figura 23), utilizando 900 μL de solución Ringer y 100 μL de la dilución anterior.

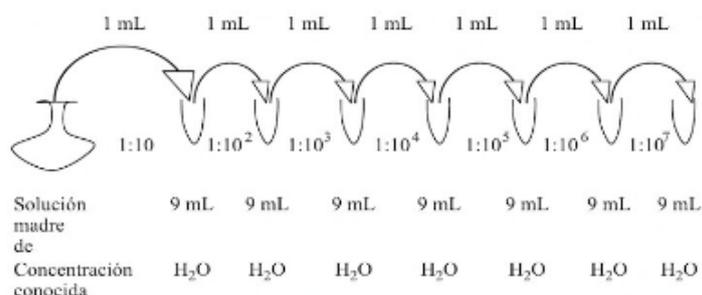


Figura 23. Diluciones seriadas 1:10

Tomado de: Casado, Durán Miró y Paredes, 2012, p. 139.

4.2.1.3. Selección de cepas en medio sólido

Se sembró, 100 μL de cada dilución por extensión en placa en un medio sólido selectivo (con petróleo como única fuente de carbono). El medio se formuló utilizando: fosfato dipotásico (1.5 g/L, Lobachemie), fosfato monobásico de potasio (0.5 g/L, Fisher Scientific), sulfato de amonio (0.5 g/L, Fisher Scientific), cloruro de sodio (0.5 g/L, Fisher Scientific), sulfato de magnesio (3 g/L, Lobachemie), sulfato de hierro (0.002 g/L, Lobachemie), cloruro de calcio (0.002 g/L), agar-agar (15 g/L) y petróleo (0.5% y 0.7%) (Echeverri *et al.*, 2010, p. 78). Todos los medios fueron esterilizados mediante autoclave.

Para el caso de la muestra del Oleoducto San Miguel Lago Agrio del kilómetro 2 (OSLA K2) se utilizó la dilución 10^{-5} , como placas válidas para el conteo para las muestras del Oleoducto San Miguel Lago Agrio del kilómetro 14 (OSLA K14) y la muestra del Sistema de Oleoductos Transecuatoriano kilómetro 110 (SOTE K110) se utilizó la dilución 10^{-4} y para la muestra del Sistema de Oleoductos

Transecuatoriano kilómetro 105 (SOTE K105) se utilizó la dilución 10^{-3} . Después del periodo de incubación (una semana a 25 °C) se seleccionaron del medio todas aquellas colonias que crecieron para aislarlas.

Además se contaron las UFC de cada placa, usando el contador de colonias y se calcularon UFC/gramo de suelo utilizando la fórmula:

(Ecuación 1)

$$\frac{UFC}{g} = \#colonias * \frac{1}{FD} * \frac{1}{Vol\ de\ siembra}$$

4.2.2. Aislamiento y caracterización morfológica macroscópica

Para el aislamiento se observó la morfología de las colonias, seleccionando colonias diferentes y separadas. En las placas se realizó una caracterización morfológica macroscópica mediante la observación de la consistencia, el color, los bordes y la elevación de la colonia.

Fue necesario que las cepas sean enriquecidas nuevamente en 8 mL de caldo nutritivo (BD) durante 24 horas a 37 °C. Después se sembró en placas de agar nutritivo (BD) durante 48 horas a 37 °C, utilizando el método de estriado por agotamiento y se repitió el procedimiento hasta obtener placas con cultivo puro. (Stanier, Ingraham, Wheelis y Painter, 1992, p. 18). Se realizó el aislamiento por triplicado para cada microorganismo encontrado. Para algunas bacterias se optó por hacer un estriado directo, ya que no presentaron mayor crecimiento en caldo nutritivo.

Una vez obtenidos los aislados también se realizó la prueba de fluorescencia. Se ubicó la placa bajo luz ultravioleta (400 nm) para observar si existe fluorescencia, algunas de las especies del género *Pseudomonas* presentan pigmentos que fluorescen a esta longitud de onda (Cox y Adams, 1985, pp. 130-131).

4.2.3. Caracterización morfológica microscópica

La caracterización morfológica microscópica se realizó mediante la tinción Gram, observación de la forma de la célula y la prueba de motilidad en el medio SIM (HIMEDIA). Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Se inoculó el medio SIM con un cultivo en caldo nutritivo de 48 horas, si se observa que solo el lugar donde se picó la aguja de siembra es turbio el microorganismo no tiene motilidad. Si la turbidez se extiende más allá de donde se picó la aguja de siembra el microorganismo tiene motilidad (Winn *et al.*, 2006, p. 220). El tiempo de inoculación del medio SIM fue de 48 horas a 37 °C.

4.2.4. Caracterización bioquímica

La caracterización bioquímica de las cepas bacterianas se llevó a cabo utilizando las pruebas: Producción de ácido en agar TSI, crecimiento en agar MacConkey, oxidasa y catalasa; realizando cada prueba por triplicado (Kohlerschmidt, Mingle y Dumas, 2015, p. 78-79) (Vivas *et al.*, 2008, p. 55).

4.2.4.1. Producción de ácido en TSI

Para esta prueba se utilizó tubos de agar TSI en pico de flauta, que fueron inoculados por picadura y superficie. El agar TSI (Titan Media) es un medio que permite determinar si un microorganismo es capaz de fermentar glucosa, sacarosa o lactosa gracias a la presencia del indicador rojo de fenol. Microorganismos fermentadores cambian el color del medio de rojo a amarillo (por la producción de ácido), si se producen gas también se formaran burbujas.

Fermentadores fastidiosos producirán una reacción ácida débil sin formación de gas. Microorganismos no fermentadores mantendrán el medio rojo, en algunas ocasiones el medio se tornará rosado gracias a la reacción de alcalinización que se produce cuando los microorganismos degradan las peptonas (Kohlerschmidt,

et al., 2015, p. 81). Se incubo a 37 °C durante 24 horas.

4.2.4.2. Crecimiento en agar MacConkey

El agar MacConkey (BD) es un medio que permite identificar microorganismos fermentadores de lactosa mediante el indicador rojo de fenol. Contiene cristal violeta y sales biliares (que inhiben el crecimiento de la mayoría de Gram positivos y algunos Gram negativos).

Los microorganismos fermentadores crecerán como colonias púrpura (debido a la producción de ácidos y la presencia de rojo fenol), los no fermentadores crecen como colonias incoloras. Los no fermentadores o fermentadores fastidiosos pueden tardar hasta 15 días en crecer en el medio (Kohlerschmidt *et al.*, 2015, p. 81). Las placas fueron incubadas durante 48 horas (las que presentaron crecimiento) y durante 15 (aquellas que no crecieron) a 37 °C

4.2.4.3. Prueba oxidasa

La prueba oxidasa se realizó mediante tiras reactivas (Hardy Diagnostics), que están impregnadas con dihidrocloro tetrametil-p-fenilemdiamina y dimetil sulfóxido (aumenta permeabilidad en las células). Cuando el primer compuesto se encuentra en su estado reducido es incoloro, pero al tener contacto con un microorganismo que tenga la enzima citocromo oxidasa y con oxígeno atmosférico se oxida, formando azul de indofenol (compuesto color violeta) (Winn *et al.*, 2006, pp. 613, 1687).

4.2.4.1. Prueba catalasa

Para la prueba catalasa se utilizó peróxido de hidrógeno al 30%, cuando el microorganismo es catalasa positivo (presenta la enzima catalasa) ocurre la transformación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (que se desprende formando burbujas) (MacFaddin, 2003, pp. 73-74).

4.2.5. Aproximación sobre los géneros bacterianos

Las bacterias se identificaron mediante observación en el microscopio (tinción Gram y morfología) y pruebas bioquímicas utilizadas por los protocolos de Kohlerschmidt *et al.* (2015, p. 78-80) y Vivas *et al.* (2008, p. 55).

4.2.6. Determinación del género *Pseudomonas*

Se utilizó agar *Pseudomonas* (BD) para la detección de *Pseudomonas* spp. (BD, 2003, p. 1); debido a que este género es de gran interés para el desarrollo de nuevas metodologías de remediación, ya que existen muchas especies con propiedades de utilidad (Echeverri *et al.*, 2010, p. 84). La incubación ocurrió a temperatura ambiente durante 72 horas.

4.2.7. Conservación

Las cepas fueron conservadas mediante congelación en glicerol al 30%.

4.3. Evaluación estadística de los resultados

Se analizó los resultados mediante la prueba no paramétrica de Welch con una significancia de 0.05%, para encontrar diferencias estadísticamente significativas entre las dos concentraciones de petróleo usadas. Mientras que se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con una significancia del 0.05% para encontrar diferencias estadísticamente significativas entre las distintas diluciones sembradas para el conteo.

Se utilizaron pruebas no paramétricas debido a que en estudios con menos de 30 unidades experimentales es común que no se presente una distribución normal de los datos (Álvarez, 1995, p. 306).

5. Resultados y discusión

5.1. Muestreo

Se obtuvieron cuatro muestras, provenientes de cuatro diferentes localidades (kilómetro 2 y kilómetro 14 del Oleoducto San Miguel Lago Agrio y kilómetro 105 y kilómetro 110 del Sistema de Oleoductos Transecuatoriano). Las muestras fueron conservadas a 4°C desde el muestreo hasta su procesamiento (2 meses después), las muestras fueron guardadas durante un período tan largo por algunos problemas logísticos.

5.2. Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos

Los datos obtenidos sobre la concentración de microorganismos se presentan en la tabla 4, mostrando valores entre $4.4E+04$ UFC/g y $8.8E+06$. Otros estudios sobre poblaciones autóctonas degradadoras de hidrocarburos han obtenido concentraciones del orden de 10^5 a 10^9 UFC/g (Martínez, Pérez, Pinto, Gurrola y Osorio, 2011, p. 247) (Nápoles, Marañón, Cumbá, Anllo y Abalos, 2005, p. 184). Es posible que una buena parte de la población degradadora se perdiera durante el almacenamiento antes del procesamiento de las muestras (2 meses), ya que se recomienda que el tiempo no exceda los 14 días (Ministerio del Ambiente de Perú, 2014, p. 22).

Tabla 4.

UFC/g para las distintas localidades y concentraciones de petróleo

Localidad	UFC/g	
	Petróleo 0.5%	Petróleo 0.7%
1 OSLA K2	7,0E+06	8,1E+06
	6,2E+06	8,8E+06
2 OSLA K14	7,1E+05	1,1E+06
	6,4E+05	1,2E+06
3 SOTE K105	5,6E+04	1,5E+05
	4,4E+04	9,0E+04
4 SOTE K110	7,3E+05	7,4E+05
	7,1E+05	9,7E+05

5.2.1. Oleoducto San Miguel Lago Agrio kilómetro 2 (OSLA K2):

Las unidades experimentales (placas) para las dos distintas concentraciones de petróleo se presentan en las figuras 24, 25, 26 y 27, las UFC se contaron en contador de colonias:



Figura 24. Medio 0.5% petróleo, repetición 1, 139 colonias, $7E+06$ UFC/g de suelo.

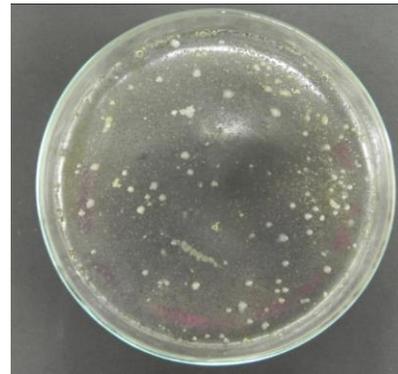


Figura 25. Medio 0.5% petróleo, repetición 2, 124 colonias, $6.2E+06$ UFC/g de suelo.

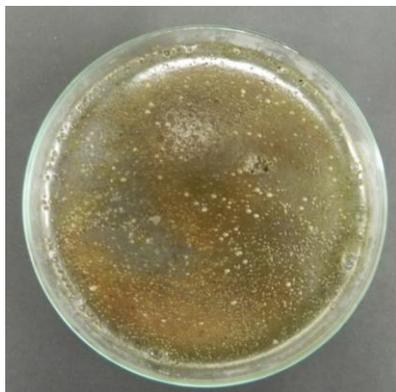


Figura 26. Medio 0.7% petróleo, repetición 1, 162 colonias, $8.1E+06$ UFC/g de suelo.

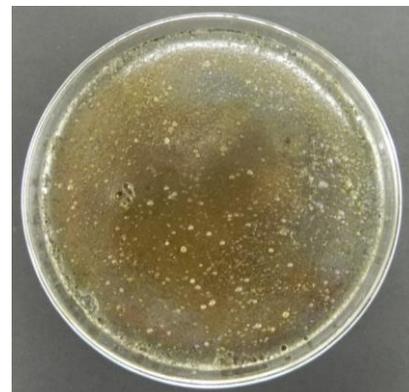


Figura 27. Medio 0.7% petróleo, repetición 2, 176 colonias, $8.8E+06$ UFC/g de suelo.

El derrame ocurrido en el kilómetro 2 del Oleoducto San Miguel Lago Agrio probablemente era el más antiguo, esto gracias a que en esta muestra se encontraba la mayor cantidad de microorganismos (se utilizó la mayor dilución para obtener placas válidas para el conteo) (Tortora *et al.*, 2007, p. 178) y la

contaminación por petróleo no fue evidenciable a simple vista en la muestra (probablemente se encontraba en una etapa avanzada de la degradación del contaminante). Se encontraron tres morfologías bacterianas en esta muestra.

5.2.2. Oleoducto San Miguel Lago Agrio kilómetro 14 (OSLA K14):

Las unidades experimentales (placas) para las dos distintas concentraciones de petróleo se presentan en las figuras 28, 29, 30 y 31, las UFC se contaron en contador de colonias:



Figura 28. Medio 0.5% petróleo, repetición 1, 141 colonias, $7E+05$ UFC/g de suelo.



Figura 29. Medio 0.5% petróleo, repetición 2, 128 colonias, $6.4E+05$ UFC/g de suelo.

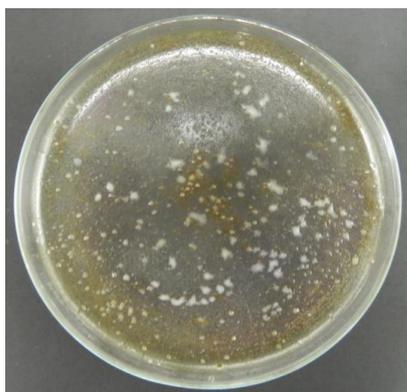


Figura 30. Medio 0.7% petróleo, repetición 1, 228 colonias, $1.1E+06$ UFC/g de suelo.



Figura 31. Medio 0.7% petróleo, repetición 2, 236 colonias, $1.2E+06$ UFC/g de suelo.

Las muestra obtenida del kilómetro 14 del Oleoducto San Miguel Lago Agrío, tuvo una pequeña cantidad evidenciable de petróleo a simple vista, y se encontraron tres morfologías bacterianas.

5.2.3. Sistema de Oleoductos Transecuatoriano kilómetro 105 (SOTE K105):

Las unidades experimentales (placas) para las dos distintas concentraciones de petróleo se presentan en las figuras 32, 33, 34 y 35, las UFC se contaron en contador de colonias:



Figura 32. Medio 0.5% petróleo, repetición 1, 111 colonias, $5.6E+04$ UFC/g de suelo.



Figura 33. Medio 0.5% petróleo, repetición 2, 88 colonias, $4.4E+04$ UFC/g de suelo.

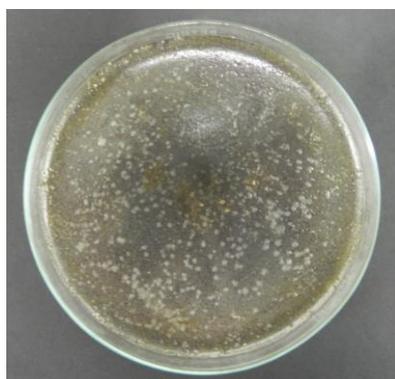


Figura 34. Medio 0.7% petróleo, repetición 1, 295 colonias, $1.5E+05$ UFC/g de suelo.

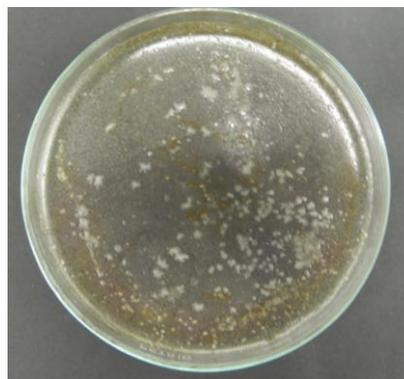


Figura 35. Medio 0.7% petróleo, repetición 2, 180 colonias, $9E+04$ UFC/g de suelo.

Para la muestra del kilómetro 105 del Sistema de Oleoductos Transecuatoriano, se puede concluir que probablemente fue el derrame más reciente, debido a que se utilizó la segunda dilución para la muestra (Tortora *et al.*, 2007, p. 178), se observó la mayor cantidad de petróleo a simple vista y se encontraron solo dos morfologías bacterianas.

5.2.4. Sistema de Oleoductos transecuatoriano kilómetro 110 (SOTE K110):

Las unidades experimentales (placas) para las dos distintas concentraciones de petróleo se presentan en las figuras 36, 37, 38 y 39, las UFC se contaron en contador de colonias:

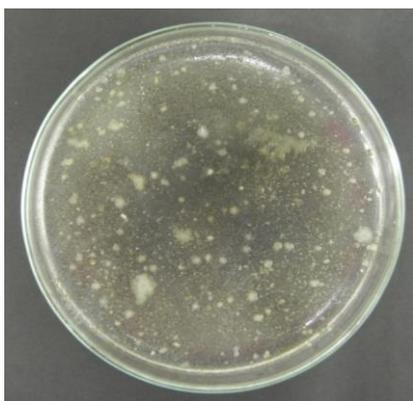


Figura 36. Medio 0.5% petróleo, repetición 1, 145 colonias, $7.3E+05$ UFC/g de suelo.

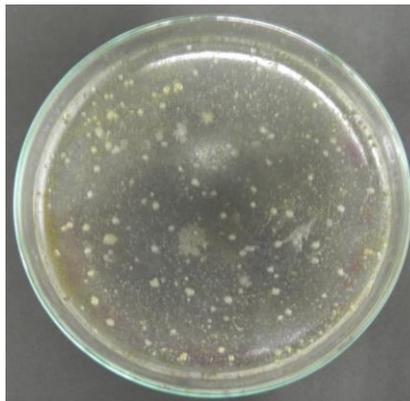


Figura 37. Medio 0.5% petróleo, repetición 2, 142 colonias, $7.1E+05$ UFC/g de suelo.

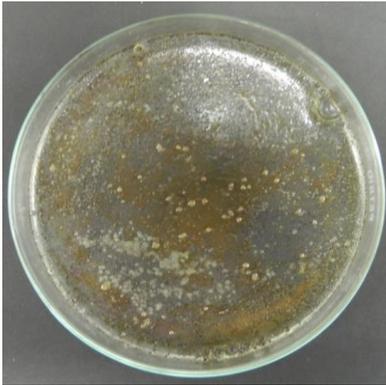


Figura 38. Medio 0.7% petróleo, repetición 1, 147 colonias, $7.4E+05$ UFC/g de suelo.

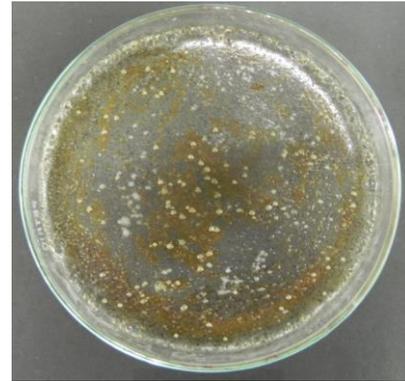


Figura 39. Medio 0.7% petróleo, repetición 2, 194 colonias, $9.7E+05$ UFC/g de suelo.

La muestra obtenida del kilómetro 110 del Sistema de Oleoductos Transecuatoriano, tuvo una pequeña cantidad evidenciable de petróleo a simple vista, y se encontraron tres morfologías bacterianas.

5.3. Aislamiento

Para llevar a cabo el aislamiento se determinó los diferentes tipos de colonias en cada placa, en base a su morfología (consistencia, tipo de borde, color y elevación de la colonia). La información se presenta en la tabla 5.

Tabla 5.

Caracterización morfológica macroscópica para las colonias de todas las localidades

Localidad	Colonia	Consistencia	Borde	Color	Elevación
OSLA K2	Colonia 1: Borde Irregular (BI)	Membranosa	Irregular	Blanco	Plana
	Colonia 2: Borde regular (BR)	Membranosa	Regular	Blanco	Convexa
	Colonia 3: Consistencia acuosa (CA)	Acuosa	Regular	blanco	Elevada
OSLA K14	Colonia 1: Borde Irregular (BI)	Cremosa	Irregular	Blanco	Plana
	Colonia 2: Borde Regular (BR)	Cremosa	Regular	Blanco	Convexa
	Colonia 3: Consistencia acuosa (CA)	Acuosa	Regular	blanco	Elevada
SOTE K105	Colonia 1: Borde Regular (BR)	Cremosa	Regular	Blanco	Convexa
	Colonia 2: Consistencia acuosa (CA)	Acuosa	Regular	blanco	Elevada
SOTE K110	Colonia 1: Color Amarillo (CA)	Cremosa	Regular	Amarillo	Convexa
	Colonia 2: Color Blanco (CB)	Cremosa	Regular	Blanco	Convexa
	Colonia 3: Color Rojo (CR)	Acuosa	Regular	Rojo	Convexa

Después de dos rondas de estriado por agotamiento en placa (Anexo 13 – Anexo 31), se obtuvieron cultivos puros para todas las colonias excepto la colonia de bordes regulares de OSLA K2 y la colonia de consistencia acuosa de OSLA K2.

Se disminuyó los tiempos y temperatura de incubación para frenar un poco el crecimiento y facilitar el aislamiento (Silva, Pino, Acosta, Salazar y Saboya, 2000, p. 67), sin embargo no se logró aislar estas dos colonias. También se hizo estrías directamente desde las colonias, esta técnica de aislamiento fue utilizada para las colonias de color rojo y amarillo de SOTE K110, sin embargo no se logró el aislamiento de ninguna de las dos bacterias de OSLA K2.

Esto probablemente se deba a que ambas formaron un consorcio bacteriano y no podían crecer separadas por que su crecimiento dependía de una relación sintrófica (Solera *et al.*, 2014, p. 35) (Corrales, Antolinez, Bohórquez y Corredor, 2015, p. 56).

Las colonias que pudieron ser aisladas de las diferentes localidades se encuentran en las figuras 40, 41, 42 y 43.



Figura 40. Colonia aislada BI y consorcio que no fue posible aislar de la muestra OSLA K2.



Figura 41. Colonias aisladas de OSLA K14 (BR, CA Y BI).

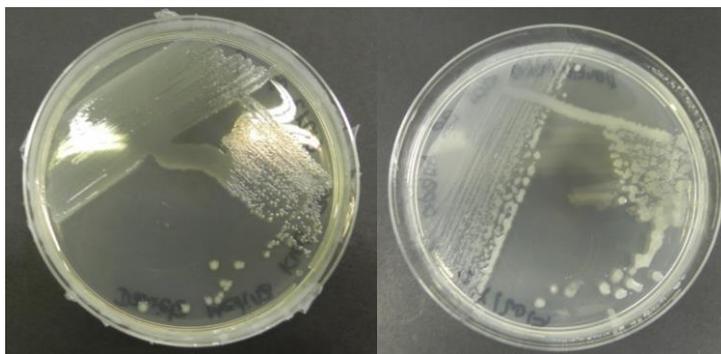


Figura 42. Colonias aisladas de SOTE K105 (BR y CA).



Figura 43. Colonias aisladas de SOTE K110 (CA, CB y CR).

5.4. Caracterización morfológica microscópica

Se obtuvo los datos de tipificación Gram y morfología de la célula (Anexo 32 – Anexo 40) y motilidad (Anexo 41 – Anexo 44), presentados en la tabla 6.

Tabla 6.

Caracterización morfológica microscópica

Zona	Bacteria	Tipificación Gram	Morfología	Motilidad
OSLA K2	Colonia 1: Borde Irregular (BI)	Positivo	Bacilo	Positivo
	Colonia 1: Borde Irregular (BI)	Positivo	Bacilo	Positivo
OSLA K14	Colonia 2: Borde Regular (BR)	Negativo	Cocobacilo	Positivo
	Colonia 3: Consistencia acuosa (CA)	Negativo	Bacilo	Positivo
SOTE K105	Colonia 2: Borde Regular (BR)	Negativo	Cocobacilo	Positivo
	Colonia 3: Consistencia acuosa (CA)	Negativo	Bacilo	Positivo
SOTE K110	Colonia 1: Color Amarillo (CA)	Negativo	Bacilo	Sin crecimiento
	Colonia 2: Color Blanco (CB)	Negativo	Bacilo	Positivo
	Colonia 3: Color Rojo (CR)	Negativo	Bacilo	Sin crecimiento

La mayoría de microorganismos encontrados fueron cocobacilos y bacilos Gram negativos, se encontraron además dos bacilos Gram positivos. La predominancia de bacterias Gram negativas ocurre gracias a que los lipopolisacáridos presentes en las membranas contribuyen a la formación y estabilización de emulsiones de hidrocarburos. Gracias a esto la superficie de ataque contra el contaminante aumenta y debido a que el contaminante y los lipopolisacáridos son de la misma naturaleza polar se facilita la unión del contaminante con la célula (Sikkema, Bont y Poolman, 1995, p. 203).

Se observa que todas las morfologías corresponden a bacilos y cocobacilos, probablemente debido a que estos tipos de células suelen tener flagelos con mucha más frecuencia que los cocos (Kotcher y Ness, 2005, p. 101). Se conoce que algunas células con flagelos tienen determinados sistemas que les permiten detectar y actuar frente a los contaminantes (quimiotaxis) (Velasco, 2003, p. 9).

En cuanto a la motilidad, se observó que todos los microorganismos aislados la presentan. En el caso de la muestra del SOTE K105 se observa que las bacterias aisladas son muy motiles, y la turbidez se extiende a través de todo el tubo. Las cepas correspondientes a las colonias roja y amarilla del SOTE K110 no presentaron crecimiento en medio SIM, y tuvieron problemas similares en todos los medios usados en este estudio por lo que su motilidad no pudo ser identificada. Esto puede ocurrir debido a que muchos microorganismos

ambientales son no fermentadores o fermentadores fastidiosos y no presentan crecimiento en los medios más comúnmente usados (Winn *et al.*, 2006, p. 297) (Wolfaardt, Lawrence y Caldwell, 1994, p. 338).

La motilidad es una característica importante, que contribuye con aumentar la eliminación de contaminantes (Norris, 1995, pp. 11-4-11-5). Se ha encontrado que genes relacionados a la motilidad, quimiotaxis y enzimas degradadoras de hidrocarburos se encuentran con mayor abundancia en ambientes contaminados (National Research Council, 2013, p. 100).

5.5. Caracterización bioquímica

Según todos los datos obtenidos en la caracterización morfológica microscópica (tipificación Gram y forma de la célula) se escogieron las pruebas bioquímicas de las metodologías de Kohlerschmidt *et al.* (2015, pp. 78-79) y Vivas *et al.* (2008, p. 55); que permitirían obtener una aproximación sobre los géneros bacterianos encontrados en las muestras. Los resultados para todas las pruebas se presentan en la tabla 7.

Tabla 7.

Caracterización bioquímica

Zona	Bacteria	Agar MacConkey	Agar TSI	Oxidasa	Catalasa
OSLA K2	Colonia 1: Borde Irregular (BI)	Sin crecimiento	A/K	Positivo	Positivo
	Colonia 1: Borde Irregular (BI)	Colonias blancas	A/A	Positivo	Positivo
OSLA K14	Colonia 2: Borde Regular (BR)	Sin crecimiento	A/A	Positivo	Negativo
	Colonia 3: Consistencia acuosa (CA)	Colonias blancas	A/K	Negativo	Positivo
SOTE K105	Colonia 2: Borde Regular (BR)	Colonias blancas	A/A	Positivo	Negativo
	Colonia 3: Consistencia acuosa (CA)	Colonias blancas	A/A	Positivo	Positivo
SOTE K110	Colonia 1: Color Amarillo (CA)	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Positivo	Negativo
	Colonia 2: Color Blanco (CB)	Sin crecimiento	A/A	Positivo	Negativo
	Colonia 3: Color Rojo (CR)	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Positivo	Negativo

Nota: A/K=pico ácido/fondo alcalino; A/A=Pico ácido/fondo ácido.

5.5.1. Producción de ácido en agar TSI

Se determinó la producción de ácido en agar TSI en pico de flauta (Anexo 49 – Anexo 52). Se observó que siete de las bacterias estudiadas fueron formadoras de ácido en agar TSI (se observó cambio de color del medio rojo a amarillo total o parcialmente). Para dos bacterias incluso hubo ruptura del medio (K105 BR y CA), lo que indica que son productoras de gas (Britania, *s.f.*, p. 1).

Cinco de las bacterias presentaron fondo y pico ácidos (A/A), lo que indica que son fermentadoras de al menos uno de los tres azúcares presentes en el medio (glucosa, lactosa y sacarosa), en condiciones aerobias y anaerobias (Britania, *s.f.*, p. 1).

Dos de las bacterias presentaron pico ácido y fondo alcalino (A/K). Lo que indica que no pueden fermentar azúcares en condiciones anaerobias (Britania, *s.f.*, p. 1).

Las dos restantes no presentaron crecimiento en el medio (fondo y pico alcalinos) (K/K), lo que indica que no fermentan ninguno de los tres azúcares (Britania, *s.f.*, p. 1).

Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* spp. no son capaces de crecer en medios con un pH menor a 4.5, por esta razón resultan negativas en pruebas de oxidación/fermentación de azúcares (Lalucat *et al.*, 2006, p. 522).

5.5.2. Crecimiento en agar MacConkey

Tres bacterias presentaron crecimiento en Agar MacConkey (SOTE K105 BR, SOTE K105 CA y OSLA K14 CA). El agar MacConkey es un medio que contiene lactosa como carbohidrato fermentable, lo que permite clasificar a los microorganismos en fermentadores y no fermentadores de lactosa (BD, 2013, p. 1).

Las tres bacterias preservaron su color blanco y el medio se tornó amarillo (Anexo 55, Anexo 57 y Anexo 58), lo que indica que no fermenta lactosa, sino que las bacterias utilizan las peptonas y esto alcaliniza el medio (Rodríguez *et al.*, 2005, p. 134).

Las seis restantes no fueron capaces de crecer en el medio (Anexo 53, Anexo 54, Anexo 56, Anexo 59, Anexo 60 y Anexo 61), debido a que se inhiben Gram positivas y se pueden inhibir bacterias Gram negativas con requerimientos nutricionales especiales (Winn *et al.*, 2006, p. 212).

5.5.3. Oxidasa

Se determinó la presencia de citocromos en las cepas (Anexo 62 – Anexo 65). Se obtuvo que 8 de las bacterias fueron oxidasa positivas, es decir que estas bacterias presentan el sistema citocromo oxidasa completo u otro tipo de oxidasas y pueden utilizar oxígeno como aceptor final de la cadena de electrones (aerobias y aerobias facultativas) (MacFaddin, 2003, p. 346-347).

Este resultado concuerda con la bibliografía, debido a que la degradación aeróbica del petróleo ocurre de manera más rápida que la degradación anaeróbica (Castillo *et al.*, 2005, p. 428).

La bacteria restante (OSLA K14 CA) corresponden a una bacteria oxidasa negativa, lo que indica que su aceptor final de electrones puede o no ser el oxígeno, esto ocurre porque no presentan el sistema citocromo oxidasa o lo tienen incompleto y no son capaces de actuar sobre el reactivo presente en las tiras (Pumarola *et al.*, 1987, p. 75).

5.5.4. Catalasa

Se determinó la presencia de la enzima catalasa (Anexo 66 – Anexo 69). Cuatro bacterias fueron catalasa positivas. Esto contribuye a pensar que se trata de bacterias del género *Bacillus* (en el caso de bacilos Gram positivos) (Rodríguez *et al.*, 2005, p. 217) (Vivas *et al.*, 2008, p. 55).

Y para el caso de bacilos Gram negativos podría tratarse del género *Chromobacterium*, *Pasteurella* o *Actinobacillus*, o miembros de la familia Enterobacteriaceae; todos tienen reacción catalasa positiva (Sneath, 1956, p. 91) (Jackson y Goodman, 1972, p. 75) (Scanlan, Healey, Torres y Johnston, 1989, p. 290) (Joseph, Sistla, Dutta, Badhe y Parija, 2009, p. 773).

Las cinco bacterias restantes fueron catalasa negativas.

5.6. Aproximación sobre los géneros bacterianos

Según todos los datos obtenidos se realizó una aproximación sobre el género de las bacterias en base a la metodología de Kohlerschmidt *et al.* (2015, pp. 78-79) y Vivas *et al.* (2008, p. 55). Los diagramas utilizados en la identificación se encuentran en los Anexo 70 y Anexo 71.

5.6.1. OSLA K2

En esta muestra se encontraron tres morfologías bacterianas, solo una logró ser aislada. Puede suponerse según las pruebas bioquímicas, que se trata de una bacteria del género *Bacillus*, que han sido reportadas como degradadores de hidrocarburos (Vivas *et al.*, 2008, p. 51).

5.6.2. OSLA K14

En esta muestra se encontraron tres morfologías bacterianas, para la colonia de bordes regulares puede suponerse que se trata de *Actinobacillus* sp. o *Kingella* sp. (Adetitun, Awoyemi, Adebisi, Kolawole y Olayemi, 2016, p. 41) (Ward, Singh y Van Hamme, 2003, p. 268). También podría ser *Pasteurella multocida*; sin embargo esta bacteria es patógeno en animales, y aunque puede encontrarse en suelos, no se ha reportado como degradadora de hidrocarburos, por lo que es poco probable que se trate de esta bacteria (Olson y Bond, 1968, p. 244). Las pruebas realizadas también coinciden con *Aggregatibacter aphrophilus*, sin embargo esta bacteria no ha sido reportada como degradadora de hidrocarburos, por lo que es poco probable que se trate de este microorganismo.

En el caso de la colonia de consistencia acuosa puede tratarse de *Chromobacterium* sp. o algún miembro de la familia Enterobacteriaceae, que han sido reportadas anteriormente como degradadoras de hidrocarburos (Abu y Dike, 2007, p. 4761) (Rahman, Rahman, Lakshmanaperumalsamy y Banat, 2002, p. 258).

Para la colonia de bordes irregulares puede suponerse que se trata de una bacteria del género *Bacillus*, que han sido reportadas como degradadores de hidrocarburos (Vivas *et al.*, 2008, p. 51).

5.6.3. SOTE K105

En esta muestra se encontraron dos morfologías bacterianas, para la colonia de bordes puede tratarse de *Chromobacterium* sp., *Aeromonas* sp., *Plesiomonas* sp. o *Vibrio* sp. que han sido reportadas anteriormente como degradadoras de hidrocarburos (Abu y Dike, 2007, p. 4761) (Cerniglia, 1992, p. 354) (Xu, Deng, Huang y Song, 2013, p. 5126) (Rahman *et al.*, 2002, p. 258).

Para la colonia de consistencia acuosa puede tratarse de *Actinobacillus* sp. o *Pasteurella* sp., ambas degradadoras de hidrocarburos (Adetitun *et al.*, 2016, p. 41) (Seo, Keum y Li, 2009, p. 280); también podría tratarse de *Aggregatibacter aphrophilus*, sin embargo, esta bacteria no ha sido reportada como degradadora de hidrocarburos, por lo que es poco probable que se trate de esta bacteria.

5.6.4. SOTE K110

En esta muestra se encontraron tres morfologías bacterianas, según las pruebas realizadas puede suponerse que para el caso de la colonia amarilla se trata de *Agrobacterium* sp., *Chryseobacterium* sp., *Neisseria elongata*, *Sphingobacterium* sp. o *Sphingomonas* sp.; estas bacterias se encuentran en suelos y se ha reportado que pueden ser degradadoras de hidrocarburos (Jirasripongpun, 2002, p. 298) (Wang *et al.*, 2015, p. 2286) (Mukred, Hamid, Hamzah y Yusoff, 2008, p. 2122) (Venkateswaran y Harayama, 1995, p. 772) (Parthipan *et al.*, 2017, p. 11). Podría tratarse de *Balneatrix* sp., también es degradadora de petróleo; sin embargo esta bacteria se encuentra comúnmente en ecosistemas marinos, por lo que es menos probable que se trate de este género (Bagi, Pampanin, Lazén, Bilstad y Kommedal, 2013, p. 118). También podría tratarse de *Brevundimonas* sp., sin embargo no existe bibliografía que reporte que estas bacterias degraden hidrocarburos.

Para la colonia blanca puede suponerse que se trata de *Actinobacillus* sp. o *Kingella* sp. (Adetitun *et al.*, 2016, p. 41) (Ward *et al.*, 2003, p. 268). También podría ser *Pasteurella multocida*; sin embargo esta bacteria es patógena en animales, y aunque puede encontrarse en suelos, no se ha reportado como degradadora de hidrocarburos, por lo que es poco probable que se trate de esta bacteria (Olson y Bond, 1968, p. 244). Las pruebas realizadas también coinciden con *Aggregatibacter aphrophilus*, sin embargo esta bacteria no ha sido reportada como degradadora de hidrocarburos, por lo que es poco probable que se trate de este microorganismo.

La colonia roja puede pertenecer a los géneros *Methylobacterium* sp. o *Roseomonas* sp., ambas han sido reportadas como degradadoras de petróleo (Risky, Hadibarata, Toyama, Tanaka y Mori, 2011, p. 999) (Kumari, Singh y Singh, 2012, p. 2468).

5.7. Identificación del género *Pseudomonas*

Se realizó únicamente para las bacterias Gram negativas (Anexo 72 – Anexo 78), de las cuales tres presentaron crecimiento en agar *Pseudomonas*. Aunque este medio sea selectivo, no es exclusivo para el crecimiento de bacterias de género *Pseudomonas* (BD, 2003, p. 2).

Ninguna de las bacterias que fueron aisladas, y ninguna bacteria que creció en este medio fueron asignadas como *Pseudomonas* basándose en las pruebas bioquímicas.

El agar *Pseudomonas* es un medio que facilita la producción de piocianina (pigmento azul verdoso que producen algunas especies como *P. aeruginosa*), y también inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Hardy Diagnostics, 1996, p. 1). Cuando se presentan colonias verdes o azules, corresponden a especies de *Pseudomonas* que presentan el pigmento, mientras que especies de *Pseudomonas* que no presentan el pigmento o géneros como *Burkholderia* sp., capaces de crecer en este medio, crecen con pigmentaciones diferentes (Hardy Diagnostics, 1996, p. 1).

En la prueba de fluorescencia se observó que ninguno de los microorganismos aislados presentó esta característica (Anexo 45 – Anexo 48), por lo que ninguno de estos microorganismos pertenece a especies del género *Pseudomonas* que presentan este tipo de pigmentos (Cox y Adams, 1985, p. 130).

5.8. Análisis estadístico de los resultados

Después de aplicar los tratamientos (distintas concentraciones de petróleo y distintas localidades), se observó el crecimiento de microorganismos degradadores en las distintas cajas (unidades experimentales) (Tabla 8).

Tabla 8.

UFC/g obtenidas por concentraciones de petróleo y localidades de muestreo

Localidad		UFC/g	UFC/g
		Petróleo 0.5%	Petróleo 0.7%
1	OSLA K2	7,0E+06	8,1E+06
		6,2E+06	8,8E+06
2	OSLA K14	7,1E+05	1,1E+06
		6,4E+05	1,2E+06
3	SOTE K105	5,6E+04	1,5E+05
		4,4E+04	9,0E+04
4	SOTE K110	7,3E+05	7,4E+05
		7,1E+05	9,7E+05

5.8.1. Análisis de la variable concentración de petróleo

Para el análisis de varianza con respecto a la variable concentración de petróleo, se planeó utilizar la prueba T de Student. Primero se tuvo que demostrar que la distribución de los datos sea normal (Moncada, 1970, p. 14). Para esto se utilizó la prueba Shapiro-Wilk en el programa SPSS Statistics (tabla 9), prueba utilizada en experimentos con menos de 30 unidades experimentales (Álvarez, 2007, p. 499). Se plantearon las hipótesis para la prueba Shapiro-Wilk (Álvarez, 2007, p. 777):

H₀: Los datos provienen de una distribución normal.

H_A: Los datos no provienen de una distribución normal.

Tabla 9.

Prueba Shapiro-Wilk

Tests of Normality							
Concentración	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
Colonias	.50	.424	8	.000	.666	8	.001
	.70	.408	8	.000	.679	8	.001

a. Lilliefors Significance Correction

El resultado de la prueba demostró que los datos no tienen una distribución normal (se rechaza la hipótesis nula), debido a que la significancia que arroja la prueba para cada tratamiento es menor al valor de $\alpha=0.05$ (Álvarez, 2007, p. 777).

Debido a que los datos no tienen una distribución normal, no se puede utilizar la prueba T de Student para el análisis (Moncada, 1970, p. 14). En su lugar se usó la prueba de U de Mann-Whitney en el programa SPSS Statistics (tabla 10), utilizada para experimentos que no tienen una distribución normal (Zapata, Dalouh, Cala y González, 2017, p. 547). Se plantearon las hipótesis para la prueba U de Mann-Whitney (Alea, Guillen, Muñoz, Torreles y Viladomiu, 2000, p.113):

H₀: No existen diferencias significativas entre los tratamientos.

H_A: Existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 10.

Prueba U de Mann-Whitney

Test Statistics ^b	
	Colonias
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	3.000
Z	-1.549
Asymp. Sig. (2-tailed)	.121
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.333 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable:
Concentración

El valor de significancia de Mann-Whitney es mayor al valor de $\alpha=0.05$; por lo que se acepta la hipótesis nula (Alea *et al.*, 2000, p.114). Por lo tanto no existen diferencias significativas en la concentración de microorganismos degradadores para las dos concentraciones de petróleo usadas.

5.8.2. Análisis de la variable localidad

Para establecer si las diferentes localidades tienen un efecto significativo sobre la concentración de microorganismos, se pretendió usar el análisis de varianza. Para ello se hizo la prueba Shapiro-Wilk con una significancia de 0.05% en el programa SPSS Statistics (tabla 11), para comprobar que los datos tuviesen una distribución normal (Díaz, 2009, p. 35). Se plantearon las hipótesis para la prueba Shapiro-Wilk (Álvarez, 2007, p. 777):

H₀: Los datos provienen de una distribución normal.

H_A: Los datos no provienen de una distribución normal.

Tabla 11.

Prueba Shapiro-Wilk

Tests of Normality							
Localidad		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Colonias	OSLA K2	.194	4	.	.968	4	.830
	OSLA K14	.285	4	.	.818	4	.138
	SOTE K105	.232	4	.	.912	4	.492
	SOTE K110	.407	4	.	.708	4	.014

a. Lilliefors Significance Correction

Se observa que todas las significancias menos la de la localidad SOTE K110, correspondieron a valores mayores que $\alpha=0.05$, aprobándose la hipótesis nula de que los datos tienen una distribución normal (Díaz, 2009, p. 35). Sin embargo es necesario que este requisito se cumpla para todos los tratamientos para que sea posible utilizar el análisis de varianza (Moore, 2000, p. 679).

Por esta razón se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis (no paramétrica) para el análisis estadístico de los datos (Álvarez, 2007, p. 828), se realizó la prueba en el programa SPSS Statistics (tabla 12). Se plantearon las hipótesis de la prueba de Kruskal-Wallis (Vargas, 1995, p. 491):

H₀: No existen diferencias significativas entre los tratamientos.

H_A: Existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 12.

Prueba de Kruskal-Wallis

Test Statistics ^{a,b}	
	Colonias
Chi-Square	6.667
df	3
Asymp. Sig.	.083

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Localidad

El valor de significancia de la prueba Kruskal-Wallis es 0.083, este valor es mayor que $\alpha=0.05$, por lo que se acepta la hipótesis nula (Alea *et al.*, 2000, p.126). Por lo tanto la variable localidad no afecta significativamente a la variable concentración de microorganismos.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1. Conclusiones

Se obtuvieron cepas degradadoras de hidrocarburos de todas las localidades muestreadas, se logró aislar 9 cepas metabolizadoras de hidrocarburos. No fueron aislados los consorcios completos, debido a que no todas las bacterias son cultivables y las técnicas de aislamiento y medios de cultivo disponibles no favorecen el crecimiento de todos los miembros del consorcio degradador. Incluso no se pudo separar un consorcio debido a posibles relaciones sintróficas que no permiten que estas bacterias puedan crecer por separado.

Las concentraciones de petróleo usadas en el medio y las localidades no son factores que influyen sobre el crecimiento bacteriano y la concentración de microorganismos.

Los cocobacilos y bacilos Gram negativos se presentan más comúnmente como degradadores de hidrocarburos gracias a las ventajas que les brinda su morfología. Todas las bacterias presentaron motilidad, lo que evidentemente les otorga ventajas de crecimiento.

La identificación mediante características morfológicas y pruebas bioquímicas no es lo suficientemente fiable, debido a que incluso entre distintas cepas de una misma especie se observan diferentes características fenotípicas y bioquímicas. Sin embargo, es de gran importancia conocer estas características, ya que se trata de un estudio exploratorio, además de que son útiles en el establecimiento de las condiciones adecuadas para el garantizar el crecimiento de degradadores durante la biorremediación, sea *in situ* o *ex situ*.

Ninguna de las bacterias aisladas fue identificada dentro del género *Pseudomonas*, que es uno de los géneros de mayor importancia en la degradación de hidrocarburos y otros contaminantes. Sin embargo, las características

bioquímicas de las diferentes cepas cambian constantemente. También se supone que algunos microorganismos pudieron haber muerto por relaciones de antagonismo en el período entre el muestreo y la selección en medio con petróleo (2 meses).

Los géneros a los que probablemente pertenecen las bacterias degradadoras son *Bacillus*, *Actinobacillus*, *Kingella*, *Chromobacterium*, algún miembro de la familia Enterobacteriaceae, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio*, *Pasteurella*, *Agrobacterium*, *Chryseobacterium*, *Neisseria elongata*, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium* y *Roseomonas*.

Gracias a su capacidad para metabolizar petróleo, estas bacterias podrían llegar a tener un gran potencial degradador. El conocimiento básico sobre su metabolismo (que se recopiló de las pruebas bioquímicas), puede utilizarse para mejorar las condiciones de crecimiento de las bacterias (bioestimulación), e incluso podrían llegar a tener un gran potencial por sí solas (bioaumentación).

6.2. Recomendaciones

Es recomendable que la inoculación de las muestras ocurra en el menor tiempo posible desde la toma de la muestra.

Al tratarse de bacterias ambientales, es preferible realizar todas las incubaciones a temperatura ambiente, o al menos aquellas en la que no se observa crecimiento después de 24 horas.

Para fermentadores fastidiosos es mejor realizar el aislamiento sin pasar por caldo nutritivo y hacerlo directamente por estriado en placa (partiendo de la colonia), para ahorrar tiempo y evitar contaminaciones.

Son necesarias metodologías de mayor resolución (como la secuenciación del ARN 16S), para la identificación precisa de género y especie.

Sería de gran utilidad realizar pruebas de actividad de degradación de TPH's individuales y en consorcio, con el objetivo de evaluar el potencial degradador de estas bacterias.

REFERENCIAS

- Abu, G. Dike, P. (2007). *A study of natural attenuation processes involved in a microcosm model of a crude oil-impacted wetland sediment in the Niger Delta*. *Bioresource Technology*, 99(11).
- Acuña, A. Tonín, N. Díaz, V. Pucci, G. Pucci, O. (2012). Optimización de un sistema de biorremediación de hidrocarburos a escala de laboratorio. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 13(1).
- Adetitun, D. Awoyemi, O. Adebisi, O. Kolawole, O. Olayemi, A. (2016). *Biodegradative activities of some Gram-negative bacilli isolated from kerosene treated soil grown with cowpea (vigna unguiculata)*. *Agrosearch*, 16(1).
- Aguilar, D. de la Rubia, D. (Eds.). (2004). *Ciencias físicas*. Editorial Reverté.
- Alea, V. Guillen, M. Muñoz, C. Torreles, E. Viladomiu, N. (2000), *Estadística con SPSS v.10.0*. Edicions Universitat de Barcelona.
- Alexander, M. (1999). *Biodegradation and bioremediation*. New York, Estados Unidos: Academic Press.
- Álvarez, R. (2007). *Estadística aplicada a las ciencias de la salud*. España: Díaz de Santos.
- Álvarez, R. (1995). *Estadística multivariante y no paramétrica con SPSS: aplicación a las ciencias de la salud*. España: Díaz de Santos.
- Álvarez, P. Illman, W. (2006). *Bioremediation and natural attenuation: Process fundamentals and mathematical models*. New Jersey, Estados Unidos: Wiley Interscience.
- Anaya, A. (2003). *Ecología química*. México DF, México: Plaza y Valdés Editores.
- Arrieta, O. Rivera, A. Arias, L. Rojano, B. Ruiz, O. Cardona, S. (2012). Biorremediación de un suelo con diésel. *Revista Gestión y Ambiente*, 15(1).
- Arrieta, O. (2011). *Evaluación de la influencia del bioestímulo sobre un suelo contaminado con diésel y su integración en la gestión ambiental*. Medellín, Colombia. Universidad Nacional de Colombia.

- Bagi, A. Pampanin, D. Lanzén, A. Bilstad, T. Kommedal, R. (2013). *Naphthalene biodegradation in temperate and arctic microcosms*. Springer, 5(1).
- Bamforth, S. Singleton, I. (2005). *Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 80(7).
- Barrios, Y. (2011). Biorremediación: una herramienta para el saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con petróleo. La Habana, Cuba: Biotecnología Aplicada, 28(2).
- Bertrand, J. Rambeloarisoa, E. Rontani, J. Giusti, G. Mattei, G. (1983). *Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture*. Biotechnology letters, 5(8).
- BD. (2013). *BD MacConkey II Agar*. Recuperado el 1 de agosto de 2017 de: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8770>
- BD. (2003). *BD Pseudomonas Agar P*. Recuperado el 3 de agosto de 2017 de: <https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/PA-257018.pdf>
- Becerril, J. Barrutia, O. Hernández-Allica, J. García-Plazaola, J. Hernández, A. Garbisu, C. (2002). *Phytoremediation and bioremediation: new biological technologies for soil pollutant contamination*. Bilbao, España: Universidad del País Vasco.
- Benavides, J. Quintero, G. Guevara, A. Jaimes, D. Gutiérrez, S. Miranada, J. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. Colombia. NOVA, 4(5).
- Bento, F. Camargo, F. Okeke, B. Frankenberger, W. (2005). *Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation*. Biosource Technology, 96(9).
- Boucias, D. Lietze, V. Teal, P. (2012). *Biocommunication of fungi*. Part III: Chemical signals that mediate insect-fungal interactions. Bürmoos, Austria: Springer.
- Bravo, E. (2007). El impacto de la explotación petrolera en los ecosistemas tropicales y la biodiversidad. Acción ecológica.

- Britania. (s.f.). *TSI agar (Triple sugar iron agar)*. Recuperado el 10 de septiembre de 2016 de: <http://www.britanialab.com/productos/B02134%20REV%2001-TSI%20AGAR.pdf>
- Cabildo, M. Cornago, M. Escolástico, C. Esteban, S. López, C. Sanz, D. (2013). Bases químicas del medio ambiente. Madrid, España: Universidad Nacional de Educación a Distancia.
- Campbell, N. Reece, J. (2007). Biología. Editorial Médica Panamericana.
- Casado, E. Durán, P. Miró, T. Paredes, A. (2012). Operaciones básicas de laboratorio. Madrid, España: Paraninfo.
- Castillo, F. Roldán, M. Blasco, R. Huertas, M. Caballero, F. Moreno, C. Martínez, F. (2005). Biotecnología ambiental. Madrid, España: Editorial Tébar.
- Castillo, I. Bárcenas, C. (1998). Pentaclorofenol: toxicología y riesgos para el ambiente. *Madera y Bosques*, 4(2).
- Cerniglia, C. (1992). *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons*. *Biodegradation*, 3(2).
- Constitución de la República del Ecuador. (2008). Artículo 401.
- Corrales, L. Antolinez, D. Bohórquez, J. Corredor, A. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *NOVA*, 13(23).
- Cox, C. Adams, P. (1985). *Siderophore activity of pioverdin for Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 48(1).
- Curtis, H. Schneek, A. Massarini, A. Barnes, S. (2008). Biología. Editorial Médica Panamericana.
- Di Conza, J. Gutkind, G. (2010). Integrones: los coleccionistas de genes. Buenos Aires, Argentina: *Revista Argentina de Microbiología*, 42(1).
- Díaz, A. (2009). Diseño estadístico de experimentos. Colección Ciencia y Tecnología.
- Echeverri, G. Manjarrez, G. Cabrera, M. (2010). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros de la Bahía de Cartagena, Colombia. *NOVA Publicación científica en ciencias biomédicas*, 8(13).

- Engelkirk, P. Duben-Engelkirk, J. Wilson, G. (2011). *Burton's microbiology for the health sciences*. Lippincott Williams and Wilkins.
- Engleberg, C. DiRita, V. Dermody, T. (2013). *Schaechter's mechanisms of microbial disease*. Lippincott Williams and Wilkins.
- Finlay, R. Lindahl, B. Taylor, A. (2008) *Responses of mycorrhizal fungi to stress: Chapter 13*. British Mycological Society Symposia Series, 27.
- Flathman, P. Jerger, D. Exner, J. (1994). *Bioremediation: field experience*. Lewis Publishers.
- Flores, A. Gálvez, J. Hernández, O. López, J. Obregón, A. Orellana, R. Otero, L. Valdés, M. (1996). *Salinidad un Nuevo concepto*. Colima, México. Universidad de Colima.
- Fontaine, G. (2003). *Petróleo y desarrollo sostenible en el Ecuador*. Quito, Ecuador. FLACSO.
- Forbes, B. Sahm, D. Weissfeld, A. (2009). *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica Panamericana.
- Galán, E. Romero, A. (2008). *Contaminación de suelos por metales pesados*. España: Revista de la Sociedad Española de Mineralogía, 10.
- García, E. Roldán, F. Garzón, L. (2011). *Evaluación de la bioestimulación (nutrientes) en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando respirometría*. Bogotá, Colombia: Acta Biológica Colombiana, 16(1).
- García, M. Peralta, M. (2008). *Cometabolismo en la biodegradación de hidrocarburos*. México: Revista Mexicana de Ingeniería Química, 7(1).
- Gómez, C. (2003). *Biodisponibilidad. Concepto y cuantificación. Aplicación a emplazamientos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos*. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla.
- González, F. (1991). *Nomenclatura de química orgánica*. Universidad de Murcia.
- Google Maps, 2017. Recuperado el 1 de junio de 2017 de: <https://www.google.com.ec/maps>
- Gordillo, J. (2004). *Petróleo y desarrollo sostenible en el Ecuador: Las propuestas. Importancia del petróleo en el Ecuador*. FLACSO Sede Ecuador.

- Gordillo, R. (2004). *Petróleo y desarrollo sostenible en el Ecuador: Las propuestas. Petróleo y ambiente en el Ecuador. FLACSO Sede Ecuador.*
- Gutiérrez, E. (1985). *Química. Barcelona, España: Editorial Reverté.*
- Hardy Diagnostics. (1996). *Pseudomonas isolation agar*. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 de: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/PseudomonasIsolationAgar.htm
- Hernández, A. Bautista, S. Velázquez, M. (2007). *Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. Revista Mexicana de Fitopatología, 25(1).*
- Jackson, F. Goodman, Y. (1972). *Transfer of the facultatively anaerobic organism bacteroides corrodens Eiken to a new genus Eikenella*. *International Journal of Systematic Bacteriology, 22(2).*
- Jirasripongpun, K. (2002). *The characterization of oil-degrading microorganisms from lubricating oil contaminated (scale) soil*. *Letters in Applied Microbiology, 35(4).*
- Joseph, N. Sistla, S. Dutta, T. Badhe, A. Parija, S. (2009). *Ventilator-associated pneumonia in a tertiary care hospital in India: incidence and risk factors*. *Journal of Infection in Developing Countries, 3(10).*
- Kohlerschmidt, D. Mingle, L. Dumas, N. (2015). *Practical Handbook of Microbiology: Identification of aerobic Gram-negative bacteria*. CRC Press.
- Kotcher, J. Ness, E. (2005). *Instrumentación quirúrgica: teoría, técnicas y procedimientos*. Editorial Médica Panamericana.
- Kumari, B. Singh, S. Singh, D. (2012). *Characterization of two biosurfactant producing strains in crude oil degradation*. *Process Biochemistry, 47(12).*
- Kuo, J. (2014). *Practical design calculations for groundwater and soil remediation*. CRC Press.

- Lalucat, J. Bennasar, A. Bosch, R. García-Valdés, E. Palleroni, N. (2006). *Biology of Pseudomonas stutzeri*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 70(2).
- Leahy, J. Colwell, R. (1970). *Microbial degradation of hydrocarbons in the environment*. Microbiological reviews, 54(3).
- Lee, K. Merlin, F. (1999). *Bioremediation of oil in shoreline environment: development of techniques and guidelines*. Pure and Applied Chemistry, 71(1).
- Levin, S. (2009). *The Princeton guide to ecology*. Princeton University Press.
- Li, G. Huang, W. Lerner, D. Zhang, X. (2000). *Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil*. Water Research, 34(15).
- Lluch, J. (2011). Tecnología y margen de refinado del petróleo. Ediciones Díaz de Santos.
- López, L. Magdaleno, A. De Cabo, L. Noriega, M. Bassi, M. Arreghini, S. Bassols, G. Wagner, M. Moreton, J. (1998). Estudios de mutagenicidad, inhibición del crecimiento algal y contaminación química en aguas superficiales de un río urbano de Buenos Aires, Argentina. Revista Internacional de contaminación ambiental, 14(1).
- MacFaddin, J. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana.
- Macy, R. (1992). Química orgánica simplificada. Editorial Reverté.
- Madigan, M. Martinko, J. Parker, J. (2004). Brock Biología de los microorganismos. Illinois, Estados Unidos: Southern Illinois University Carbondale.
- Maier, R. Pepper, I. Gerba, C. (2009). *Environmental Microbiology*. Academic Press.
- Magni, C. García-Quitans, N. Martín, M. de Mendoza, D. López, P. (2008). Sistemas de utilización de citrato en bacterias ácido lácticas. Fundamentos Biológicos, Procesos y Biotecnología de las bacterias lácticas, 1(3).
- Manahan, S. (2007). Introducción a la química ambiental. Reverté Ediciones.

- Maroto, M.; Rogel, J. (2002). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. Madrid, España; GEOCISA.
- Martínez, A. Pérez, M. Pinto, J. Gurrola, B. Osorio, A. (2011). Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alternativa de nutrientes. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27(3).
- Ministerio del Ambiente de Ecuador. (2015). Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados.
- Ministerio del Ambiente de Perú. (2014). Guía para muestreo de suelos.
- Molina, C. Point, D. (2014). Contaminación por metales pesados en la cadena trófica de los lagos Titicaca, Uru-Uru y Popó. La Paz, Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés.
- Moncada, J. (1970). Estadística para ciencias del movimiento humano. San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Moore, D. (2000). Estadística aplicada básica. Purdue University.
- Mukred, A. Hamid, A. Hamzah, A. Yusoff, W. (2008). *Enhancement of biodegradation of crude petroleum-oil in contaminated water by the addition of nitrogen sources*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(17).
- Muñoz, V. Álvarez, J. Asedegbega, E. (2016). Gestión y conservación de agua y suelos: apartado 5.5. Madrid, España: Universidad Nacional de Educación a Distancia.
- Muskus, A.; Santoyo, C.; Plata, L. (2013). Evaluación de las técnicas de atenuación natural, bioventing, bioaumentación y bioaumentación-bioventing para la biodegradación de diésel en un suelo arenoso, en experimentos en columna. Medellín, Colombia: Gestión y Ambiente, 16(2).
- National Research Council. (2013). *An ecosystem services approach to assessing the impacts of the Deepwater Horizon water spill in the gulf of Mexico*. The National Academic Press.

- Navarro, L. Álvarez, M. Grosso, J. Navarro, U. (2004). Separación y caracterización de resinas y asfaltenos provenientes del crudo Castilla. Evaluación de su interacción molecular. *Journal Ciencia, Tecnología y Futuro*, 2(5).
- Nápoles, J. Marañón, A. Cumbá, F. Anllo, Y. Abalos, A. (2005). Tratabilidad de suelos contaminados con petróleo utilizando microcosmos. *Revista Cubana de Química*, 17(1).
- Negróni, M. (2009). *Microbiología estomatológica*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Nielsen, J. (2012). *Fermentation microbiology and biotechnology: Chapter 3*. CRC Press.
- Norris, R. (1995). *In-situ biorremediation of groundwater and geological material: a review of technologies*. DIANE Publishing.
- Oilwatch. (2005). *Asalto al paraíso: Empresas petroleras en áreas protegidas*.
- Olson, L. Bond, R. (1968). *Survival of Pasteurella multocida in soil, water, carcasses and in the mouth of various birds and mammals*. Proceedings, Annual Meeting of the United States Animal Health Association, 72.
- Porta, J. López-Acevedo, M. Poch, R. (2014). *Edafología: uso y protección de suelos*. Ediciones Mundi-Prensa.
- Pumarola, A. Rodríguez, A. Garcia, J. Piedrola, G. (1987). *Microbiología y parasitología médica*. Masson.
- Parthipan, P. Preetham, E. Machuca, L. Rahman, P. Murugan, K. Rajasekar, A. (2017). *Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium Bacillus subtilis A1*. *Frontiers in Microbiology*, 8(193).
- Rahman, K. Rahman, J. Lakshmanaperumalsamy, P. Banat, I. (2002). *Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium*. *Bioresource Technology*, 85(3).
- Risky, K. Hadibarata, T. Toyama, T. Tanaka, Y. Mori, K. (2011). *Biorremediation of crude oil by white rot fungi Polyporus sp. S133*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(9).

- Rodríguez, E. Gamboa, M. Hernández, F. García, J. (2005). *Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio*. Editorial Universidad de Costa Rica.
- Ruiz, O. Álvarez, D. González-Ruiz, G. Torres, C. (2011). *Characterization of mercury biorremediation by transgenic bacteria expressing methallothionein and polyphosphate kinase*. Puerto Rico: BMC Biotechnology, 11(82).
- Saier, M. (1979). *The bacteria: a treatise on structure and function; volume VII: mechanisms of adaptation, Chapter 4*. Academic Press.
- Samanez, E. (2008). *Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo crudo*. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Sánchez, J. Rodríguez, J. (2003). *Biorremediación: fundamentos y aspectos microbiológicos*. Universidad de Oviedo.
- Santisi, S. Capello, S. Catalfamo, M. Mancini, G. Hassanshahian, M. Genovese, L. Giuliano, L. Yakimov, L. (2015). *Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium*. Brazilian Journal of Microbiology, 46(2).
- Scanlan, C. Healey, M. Torres, A. Johnston, A. (1989). *Cultural and biochemical characterization of Actinobacillus-like species from ram lambs with epididymitis*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1(4).
- Seo, J. Keum, Y. Li, Q. (2009). *Bacterial degradation of aromatic compounds*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 6(1).
- Seymour, F. Henry, J. (2001). *Assessment and management of acute poisoning by petroleum products*. Human and experimental toxicology, 20(11).
- Sigee, D. (2005). *Freshwater microbiology*. Manchester, Reino Unido: University of Manchester. Wiley.
- Sigma Aldrich. (2017). *Ringers solution ¼ strength tablets*. Recuperado el 8 de agosto de 2016 de: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/96724?lang=en®ion=EC>

- Sikkema, J. Bont, J. Poolman, B. (1995). *Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons*. American Society for Microbiology, 59(2).
- Silva, E. Pino, J. Acosta, A. Salazar, T. Saboya, M. (2000). Aislamiento de *Pseudomonas* spp. desulfurizadoras de dibenzotiofeno. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 29(1).
- Sneath, P. (1956). *Cultural and biochemical characteristics of the genus Chomobacterium*. Journal of General Microbiology, 15(1).
- Solera, R. Álvarez, C. Aymerich, E. Bedmar, E. Carballa, M. Castrillón, L. Flotats, X. Font, X. López, M. Marañón, E. Prenafeta, F. Tortosa, G. Vicent, T. (2014). *II: Aspectos biológicos de la digestión anaerobia*. Grupo Mundi-Prensa.
- Stanier, R. Ingraham, J. Wheelis, M. Painter, P. (1992). Microbiología. Editorial Reverté.
- Taiz, L. Zeiger, E. (2006). Fisiología vegetal: volumen 1. Universitat Jaume.
- Thornton, R. Neilson, R. (1998). Química orgánica. New York University. Editorial Pearson.
- Tortora, G. Funke, B. Case, C. (2007). Introducción a la microbiología. Editorial Médica Panamericana.
- Vallejo, V. Salgado, L. Roldán, F. (2005). Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. Revista Colombiana de Biotecnología, 7(2).
- Van Hamme, J. Singh, A. Ward, O. (2003). *Recent advances in petroleum microbiology*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67(4).
- Van Leeuwen, C. Hermens, J. (1995). *Risk Assesment of chemichals: an introduction*. Springer Science + Business Media.
- Vargas, A. (1995). Estadística descriptiva e inferencial. Colección Ciencia y Técnica.
- Velasco, J. Volke, T. (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. México: Instituto Nacional de Ecología.
- Velasco, P. (2003). Biorremediación: biodisponibilidad de xenobióticos en suelos papel de la quimiotaxis bacteriana. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla.

- Venkateswaran, K. Harayama, S. (1995). *Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil*. Canadian Journal of Microbiology, 41(9).
- Venosa, A. Zhu, X. (2003). *Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and fresh water wetlands*. Spill Science and Technology Bulletin, 8(2).
- Viñas, R. (2005). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica*. Universitat de Barcelona.
- Vivas, M. Martínez, M. García, F. Salgado, R. (2008). *Identificación y caracterización de una bacteria degradadora de parafinas*. Investigación Universitaria Multidisciplinaria: Ciencia y tecnología, 7(7).
- Walworth, J. Ferguson, S. (2008). *Bioremediation of petroleum hydrocarbons in cold regions: chapter 8*. Cambridge.
- Wang, J. Wang, J. Zhang, Z. Li, Y. Zhang, B. Zhang, Z. Zhang, G. (2015). *Cold-adapted bacteria for bioremediation of crude oil contaminated soil*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 91(8).
- Ward, O. Singh, A. Van Hamme, J. (2003). *Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 30(5).
- Wauquier, J. (2004). *El refinado del petróleo*. Ediciones Díaz de Santos.
- Winn, W. Allen, S. Janda, W. Koneman, E. Procop, G. Schreckenberger, P. Woods, G. (2006). *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica Panamericana.
- Wolfaardt, G. Lawrence, J. Caldwell, D. (1994). *The role of interactions, sessile growth, and nutrient amendments on the degradative efficiency of a microbial consortium*. Canadian Journal of Microbiology, 40(5).
- Wong, J. Hong, C. Nolen, G. (1997). *Design of bioremediation systems*. Lewis Publishers.

- Xu, J. Deng, H. Huang, T. Song, S. (2013). *Enhanced biodegradation of crude oil in contaminated soil by inoculation of hydrocarbon-degraders*. *Desalination and Water Treatment*, 52(25-27).
- Yanza, L. (2004). *Petróleo y desarrollo sostenible en el Ecuador: Las propuestas. El juicio a Chevron Texaco, las apuestas para el Ecuador*. FLACSO Sede Ecuador.
- Yúfera, E. (1994). *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria volumen 1*. Universidad Politécnica de Valencia. Editorial Reverté.
- Zapata, R. Dalouh, R. Cala, V. González, A. (2017). *Educación, Salud y TIC en contextos multiculturales: nuevos espacios de intervención*. Editorial Universidad de Almería.
- Zuluaga, M. Valencia, A. Ortiz, I. (2009). *Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos*. Medellín, Colombia: Universidad Pontificia Bolivariana. *Medicina UPB*, 28(1).
- Zurflu, A. (1992). *¿Superpoblación?* Madrid, España: Ediciones Rialp.

ANEXOS

Muestreo

Anexo 1 y Anexo 2. Fotografías de las biopilas ubicadas en la plataforma de tratamiento del Departamento de Restauración Ambiental “El Salado”



Anexo 3 y Anexo 4. Fotografías de las biopilas ubicadas en la plataforma de tratamiento del Departamento de Restauración Ambiental “El Salado”



Anexo 5 y Anexo 6. Fotografías de la biopila de suelo contaminado correspondiente a la localidad OSLA K2



Anexo 7 y Anexo 8. Fotografías de la biopila de suelo contaminado correspondiente a la localidad OSLA K14



Anexo 9 y Anexo 10. Fotografías de la biopila de suelo contaminado correspondiente a la localidad SOTE K105



Anexo 11 y Anexo 12. Fotografías de la biopila de suelo contaminado correspondiente a la localidad SOTE K110



Aislamiento

Anexo 13. Consorcio bacteriano de OSLA K2, 3 repeticiones



Anexo 14. Primera ronda de aislamiento para colonia de bordes irregulares (BI) de OSLA K2, 3 repeticiones



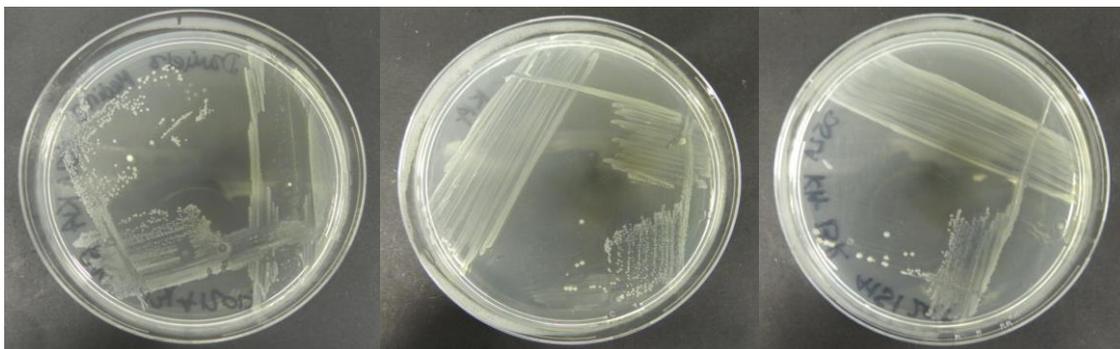
Anexo 15. Segunda ronda de aislamiento para colonia de bordes irregulares (BI) de OSLA K2, 3 repeticiones



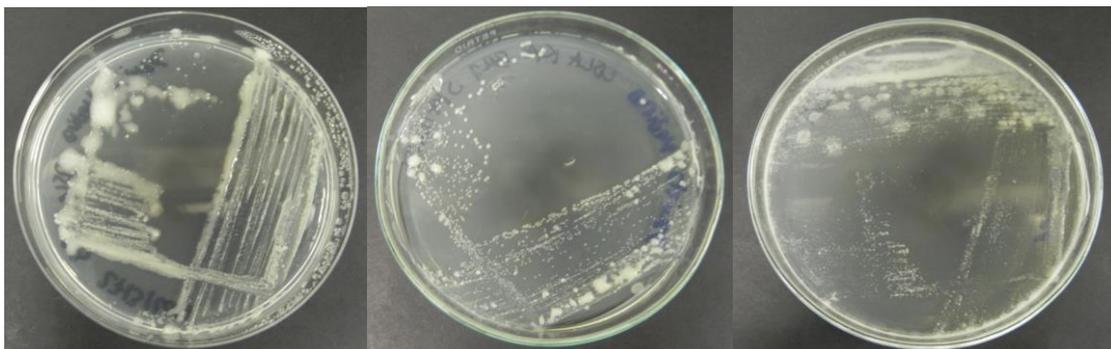
Anexo 16. Primera ronda de aislamiento para colonia de bordes regulares (BR) de OSLA K14, 3 repeticiones



Anexo 17. Segunda ronda de aislamiento para colonia de bordes regulares (BR) de OSLA K14, 3 repeticiones



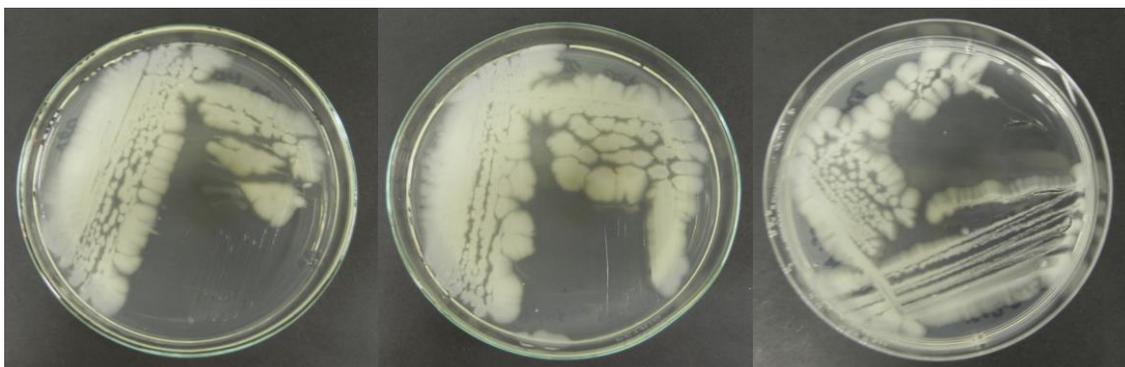
Anexo 18. Primera ronda de aislamiento para colonia de consistencia acuosa (CA) de OSLA K14, 3 repeticiones



Anexo 19. Segunda ronda de aislamiento para colonia de consistencia acuosa (CA) de OSLA K14, 3 repeticiones



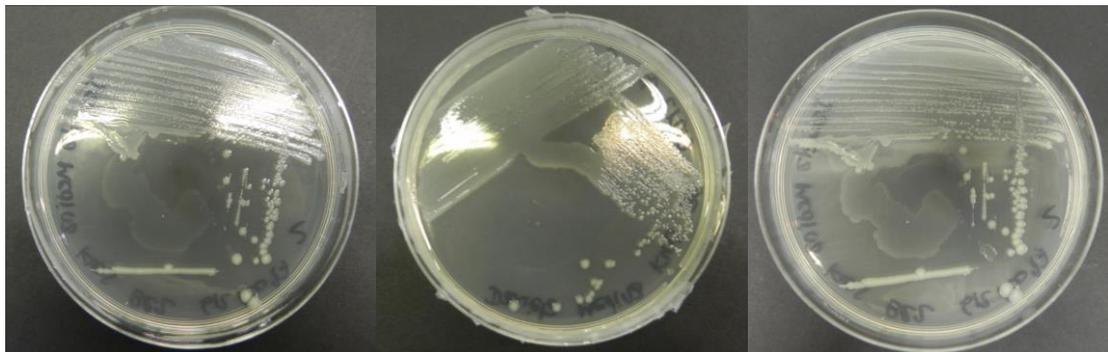
Anexo 20. Primera ronda de aislamiento para colonia de bordes irregulares (BI) de OSLA K14, 3 repeticiones



Anexo 21. Segunda ronda de aislamiento para colonia de bordes irregulares (BI) de OSLA K14, 3 repeticiones



Anexo 22. Primera ronda de aislamiento para colonia de bordes regulares (BR) de SOTE K105, 3 repeticiones



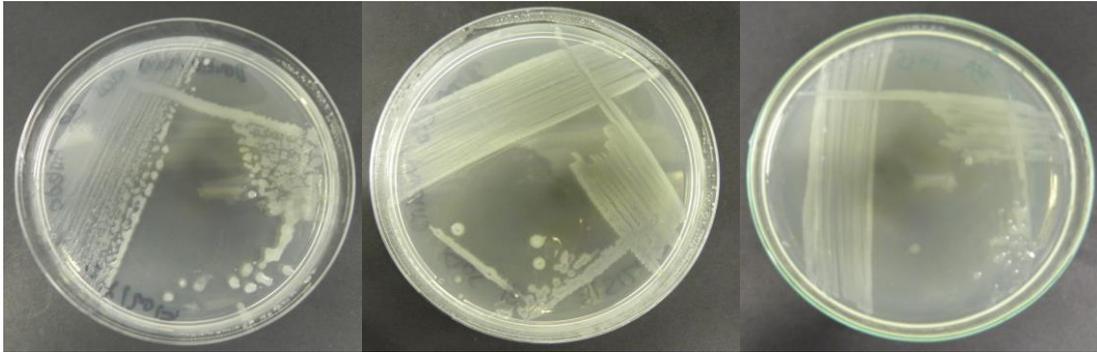
Anexo 23. Segunda ronda de aislamiento para colonia de bordes regulares (BR) de SOTE K105, 3 repeticiones



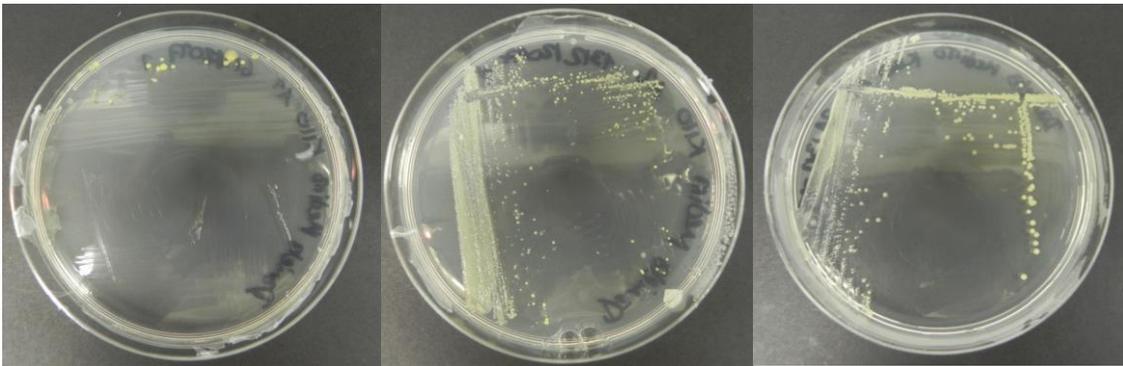
Anexo 24. Primera ronda de aislamiento para colonia de consistencia acuosa (CA) de SOTE K105, 3 repeticiones



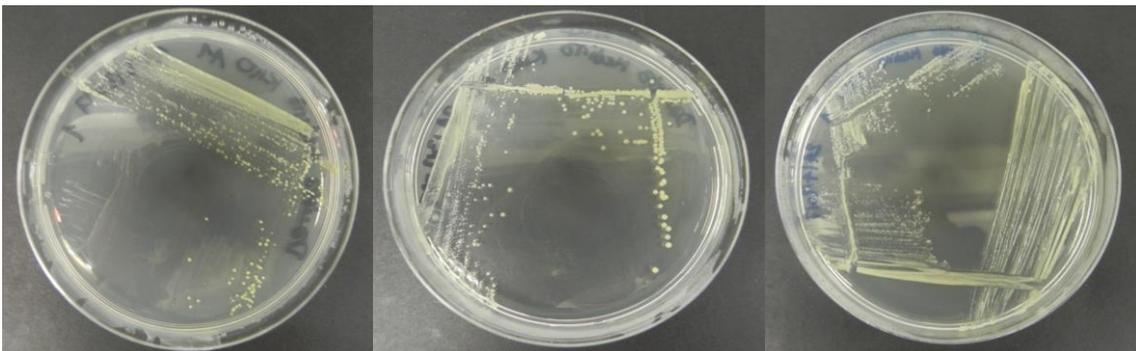
Anexo 25. Segunda ronda de aislamiento para colonia de consistencia acuosa (CA) de SOTE K105, 3 repeticiones



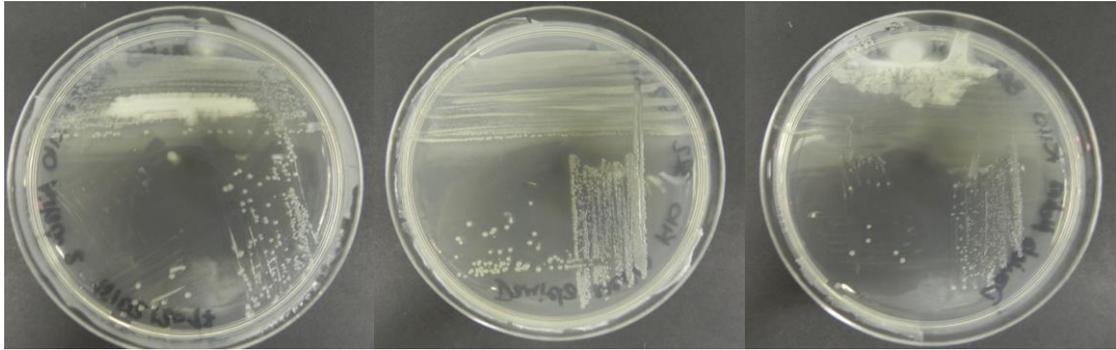
Anexo 26. Primera ronda de aislamiento para colonia de color amarillo (CA) de SOTE K110, 3 repeticiones



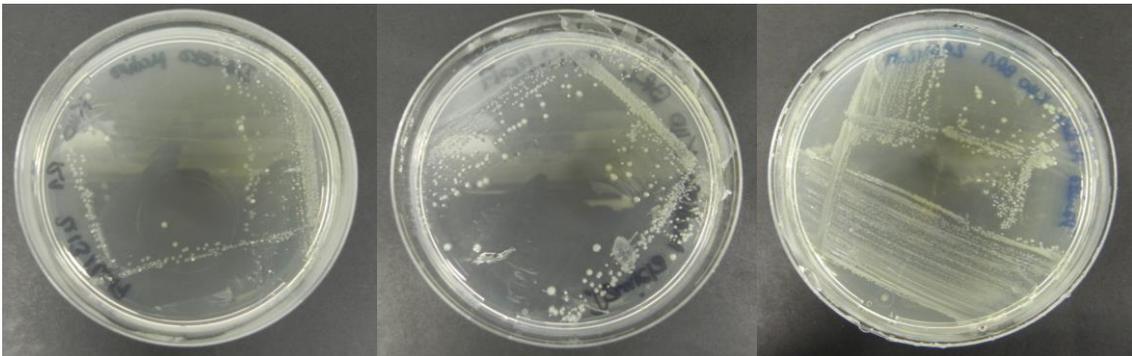
Anexo 27. Segunda ronda de aislamiento para colonia de color amarillo (CA) de SOTE K110, 3 repeticiones



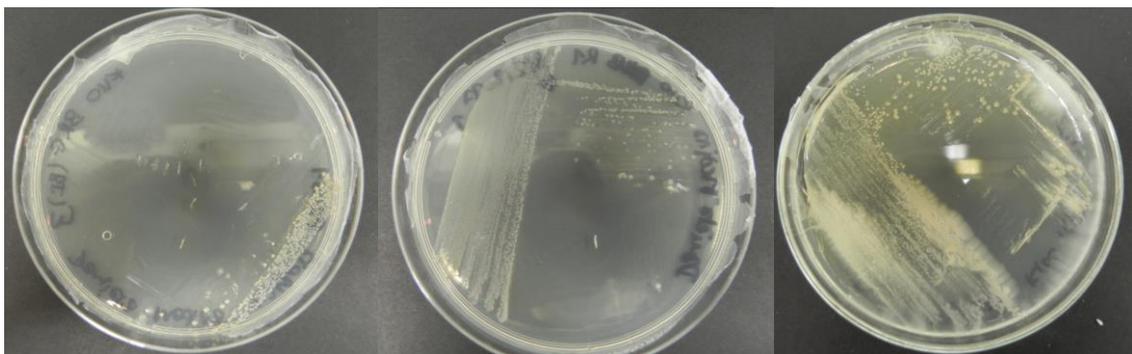
Anexo 28. Primera ronda de aislamiento para colonia de color blanco (CB) de SOTE K110, 3 repeticiones



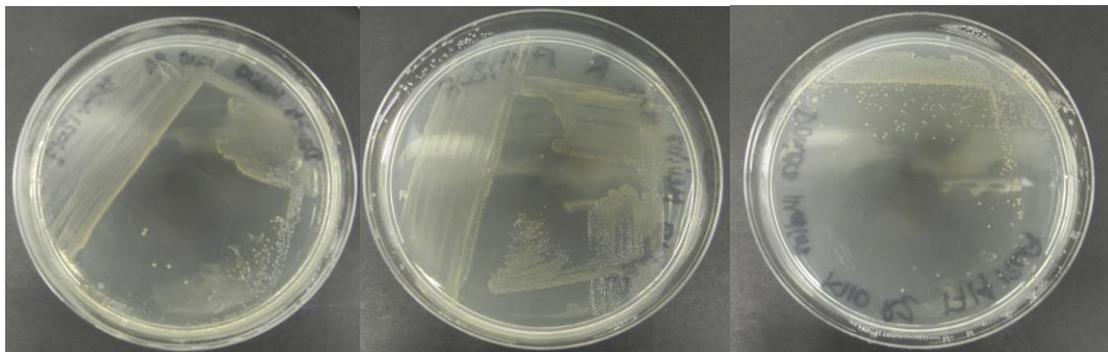
Anexo 29. Segunda ronda de aislamiento para colonia de color blanco (CB) de SOTE K110, 3 repeticiones



Anexo 30. Primera ronda de aislamiento para colonia de color rojo (CR) de SOTE K110, 3 repeticiones

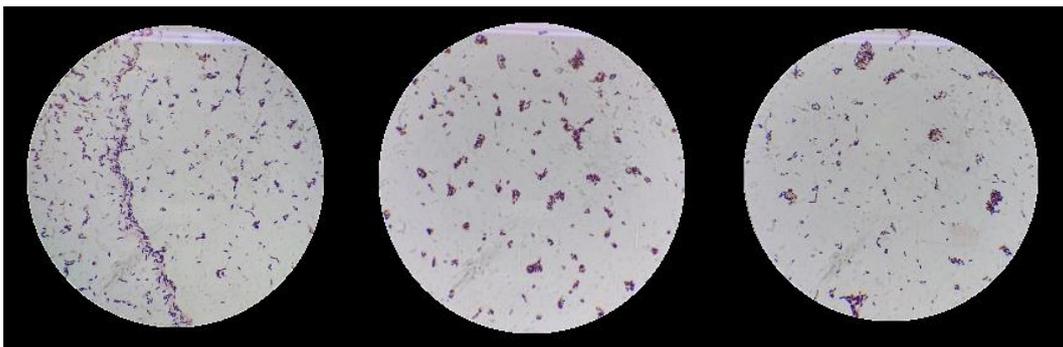


Anexo 31. Segunda ronda de aislamiento para colonia de color rojo (CR) de SOTE K110, 3 repeticiones

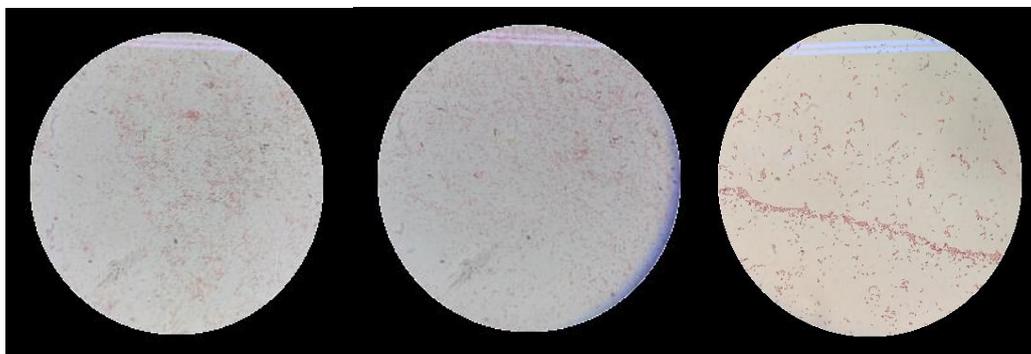


Tinción Gram

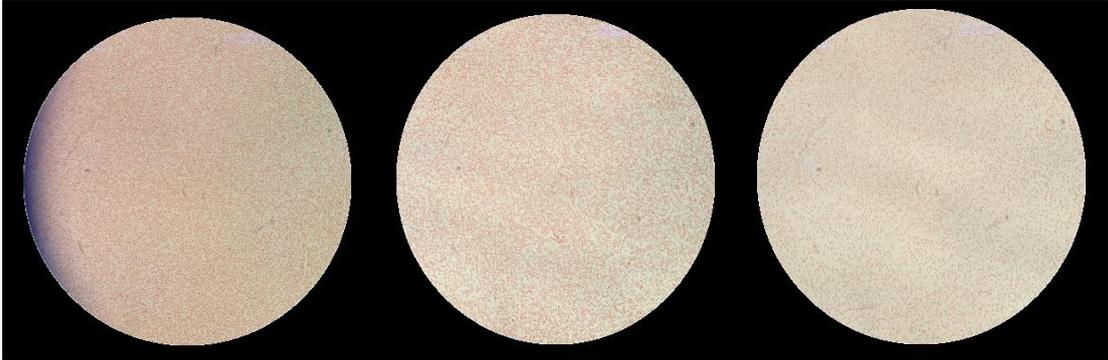
Anexo 32. Tinción Gram por triplicado para OSLA K2 BI



Anexo 33. Tinción Gram por triplicado para OSLA K14 BR



Anexo 34. Tinción Gram por triplicado para OSLA K14 CA



Anexo 35. Tinción Gram por triplicado para OSLA K14 BI



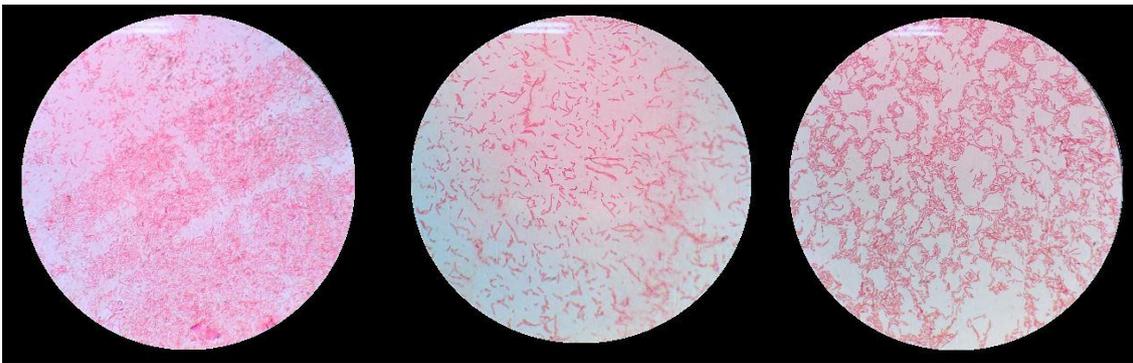
Anexo 36. Tinción Gram por triplicado para SOTE K105 BR



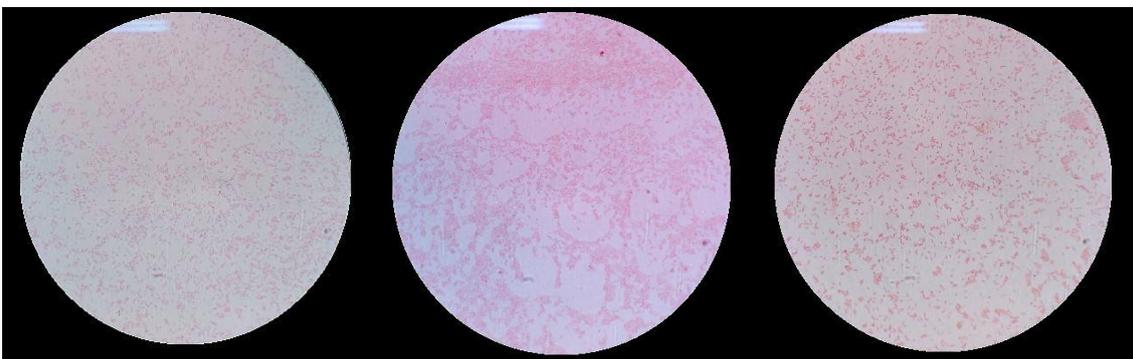
Anexo 37. Tinción Gram por triplicado para SOTE K105 CA



Anexo 38. Tinción Gram por triplicado para SOTE K110 CA



Anexo 39. Tinción Gram por triplicado para SOTE K110 CB

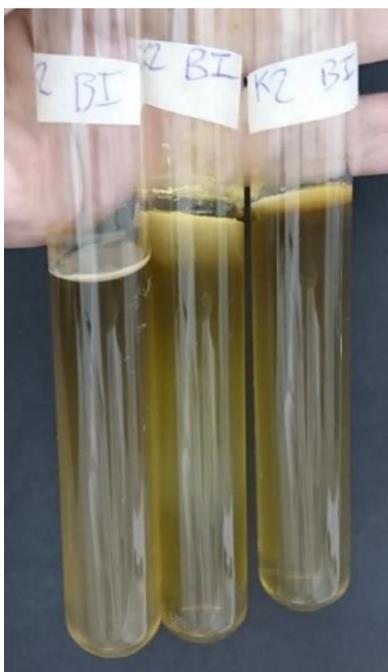


Anexo 40. Tinción Gram por triplicado para SOTE K110 CR

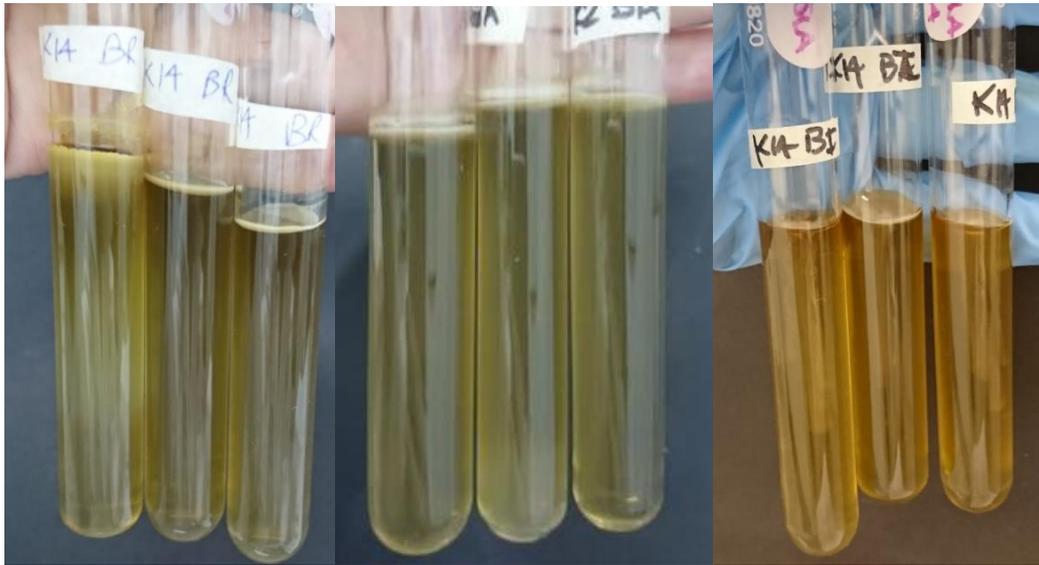


Motilidad

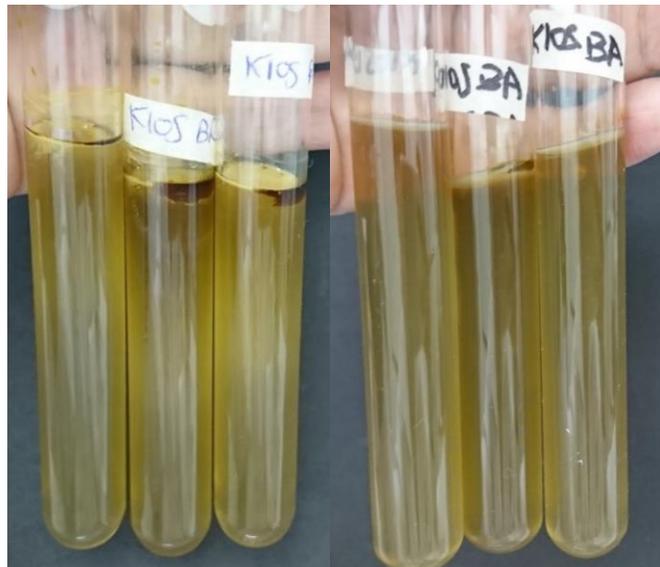
Anexo 41. Prueba de motilidad por triplicado para la bacteria de OSLA K2 (BI)



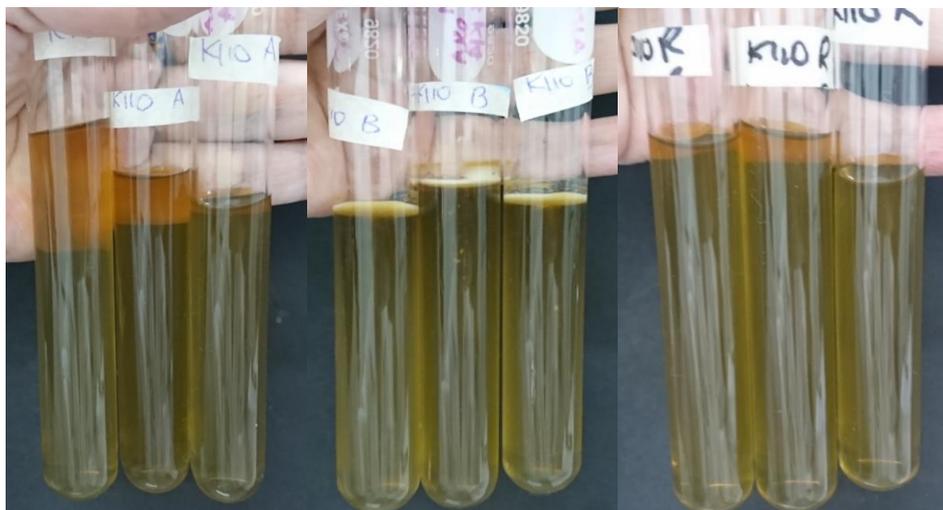
Anexo 42. Prueba de motilidad por triplicado para la bacteria de OSLA K14 (BR, CA y BI)



Anexo 43. Prueba de motilidad por triplicado para las bacterias de SOTE K105 (BR y CA)

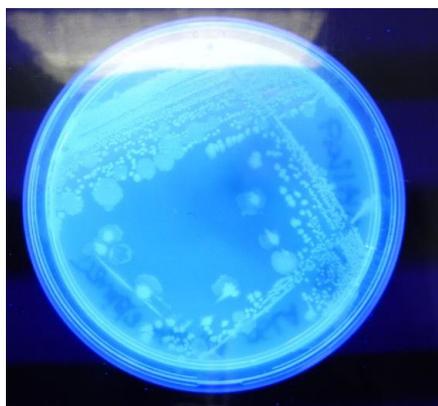


Anexo 44. Prueba de motilidad por triplicado para las bacterias de SOTE K110 (CA, CB y CR)

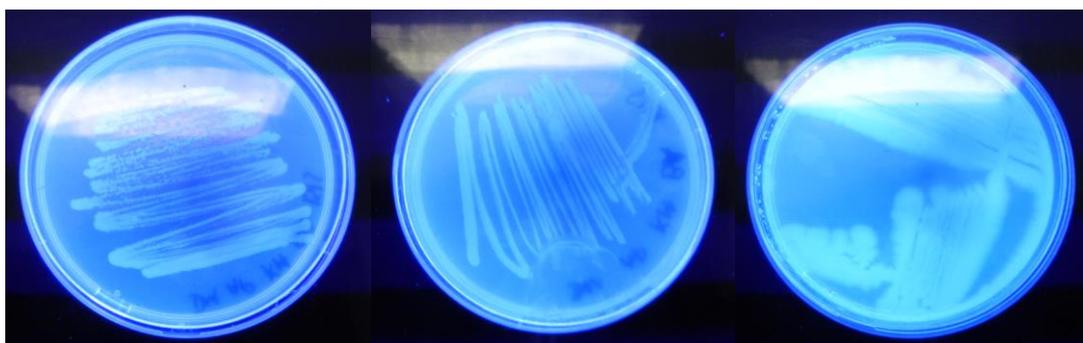


Fluorescencia

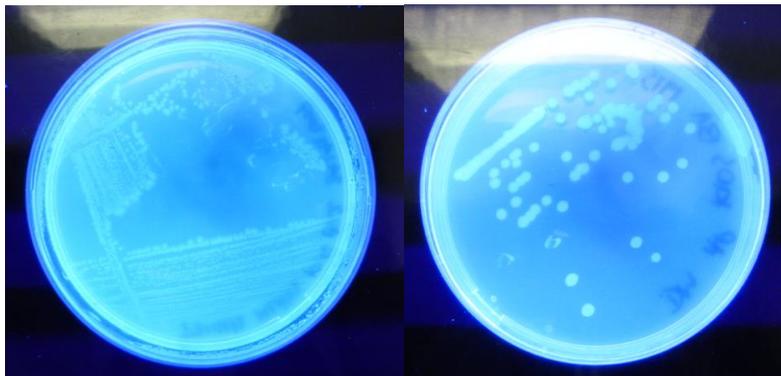
Anexo 45. Prueba de fluorescencia para la bacteria de OSLA K2 (BI)



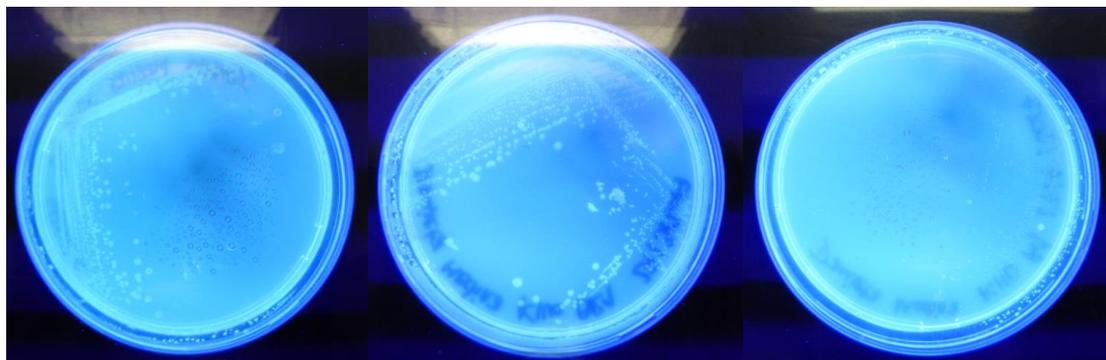
Anexo 46. Prueba de fluorescencia para las bacterias de OSLA K14 (BR, CA y BI)



Anexo 47. Prueba de fluorescencia para las bacterias de SOTE K105 (BR y CA)



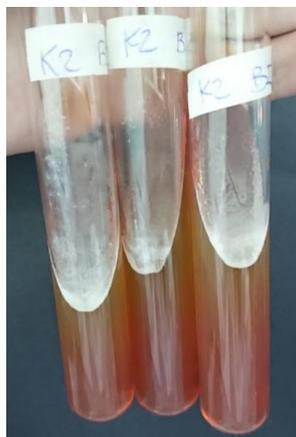
Anexo 48. Prueba de fluorescencia para las bacterias de SOTE K110 (CA, CB y CR)



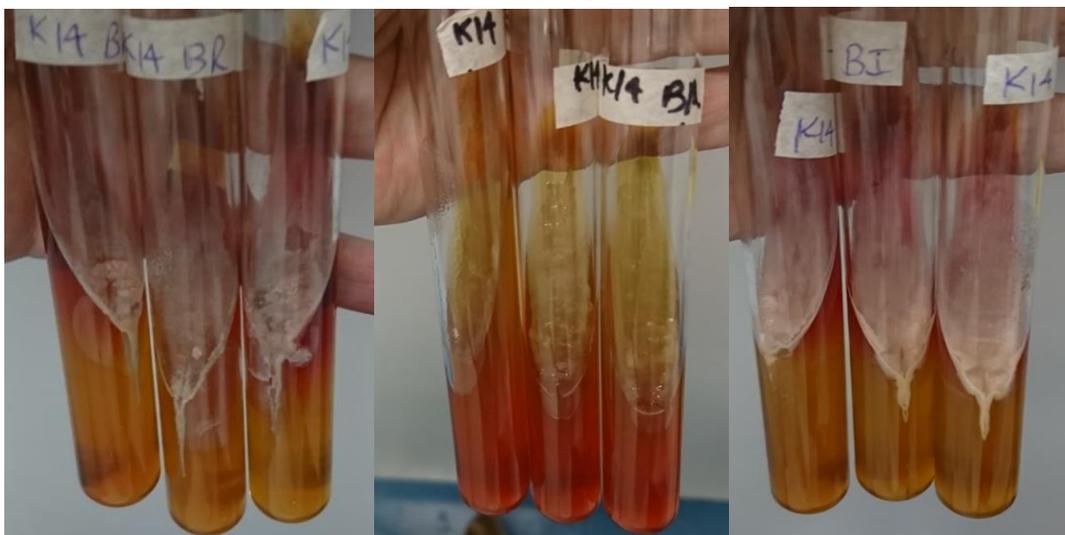
Pruebas Bioquímicas

Producción de ácido en agar TSI

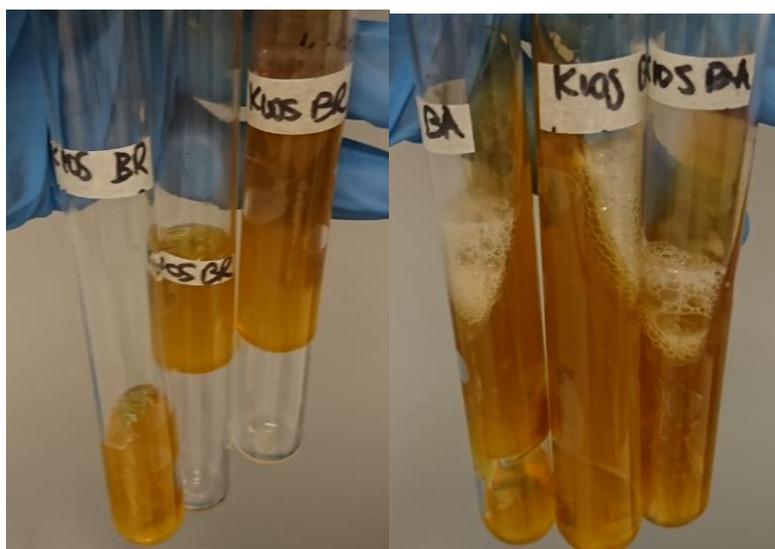
Anexo 49. Crecimiento en agar TSI en pico de flauta por triplicado para la bacteria de OSLA K14 (BI)



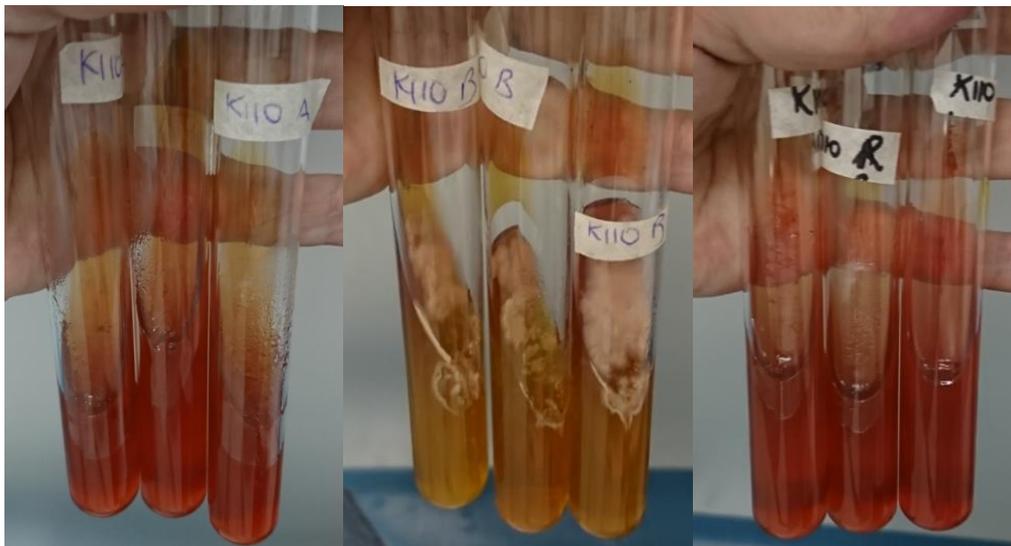
Anexo 50. Crecimiento en agar TSI en pico de flauta por triplicado para las bacterias de OSLA K14 (BR, CA y BI)



Anexo 51. Crecimiento en agar TSI en pico de flauta por triplicado para las bacterias de SOTE K105 (BR y CA)



Anexo 52. Crecimiento en agar TSI en pico de flauta por triplicado para las bacterias de SOTE K110 (CA, CB y CR)

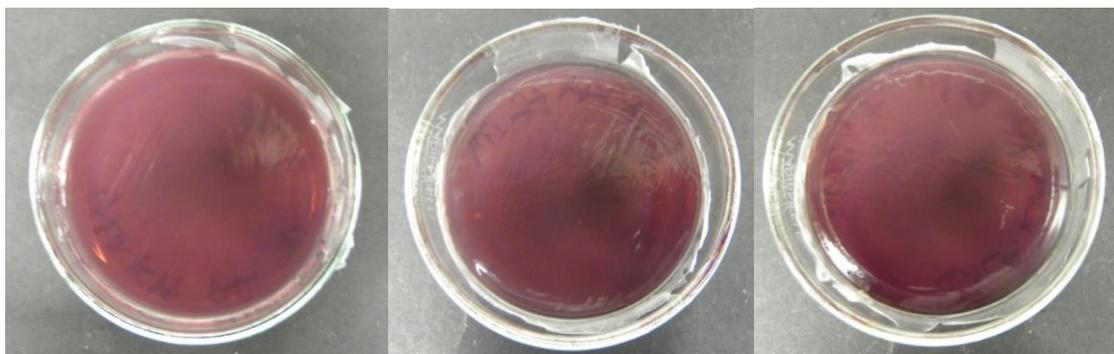


Crecimiento en agar MacConkey

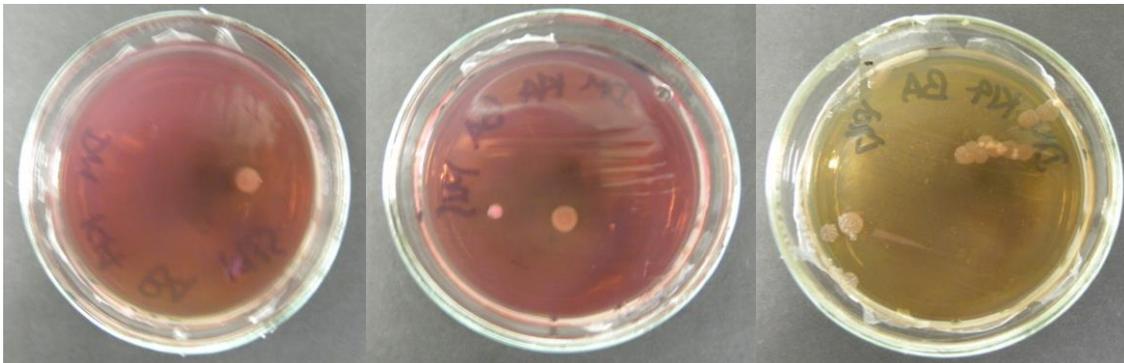
Anexo 53. Crecimiento en agar MacConkey por triplicado para OSLA K2 BI



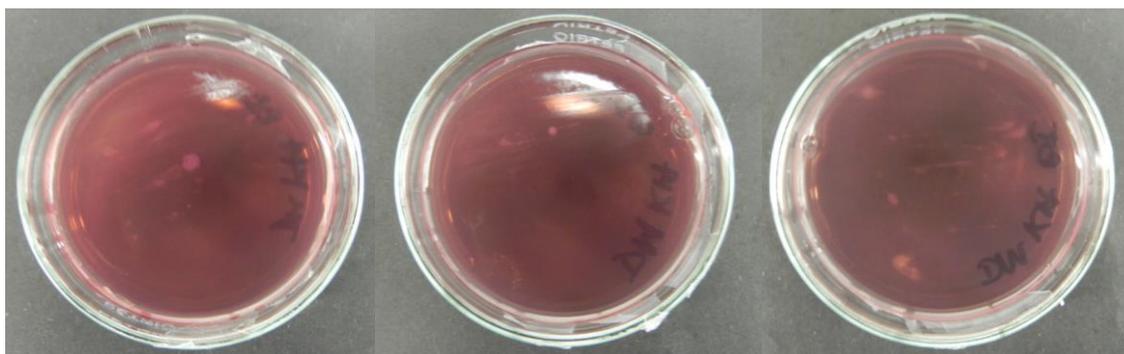
Anexo 54. Crecimiento en agar MacConkey por triplicado para OSLA K14 BR



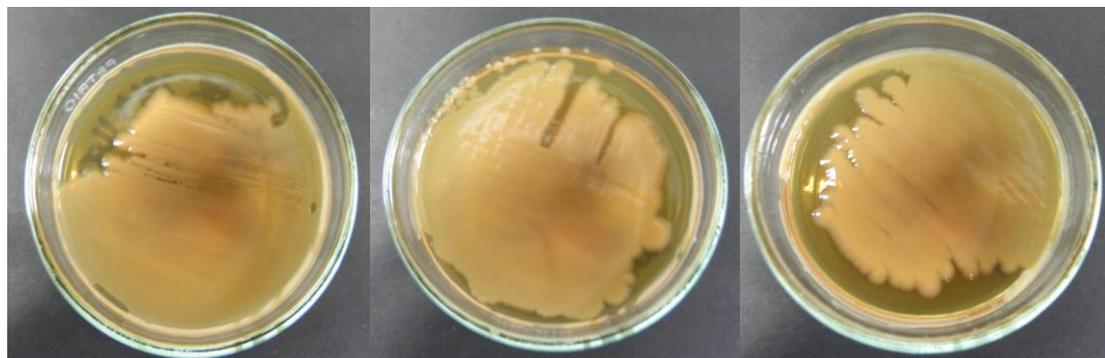
Anexo 55. Crecimiento en agar MacConkey por triplicado para OSLA K14 CA



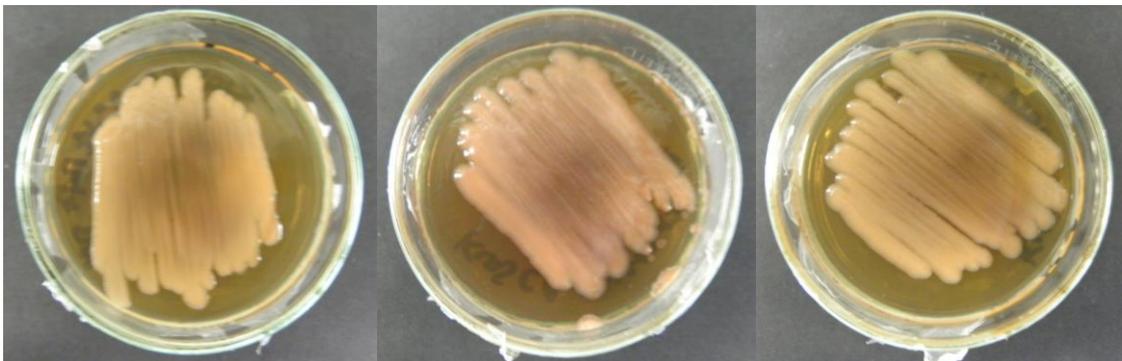
Anexo 56. Crecimiento en agar MacConkey por triplicado para OSLA K14 BI



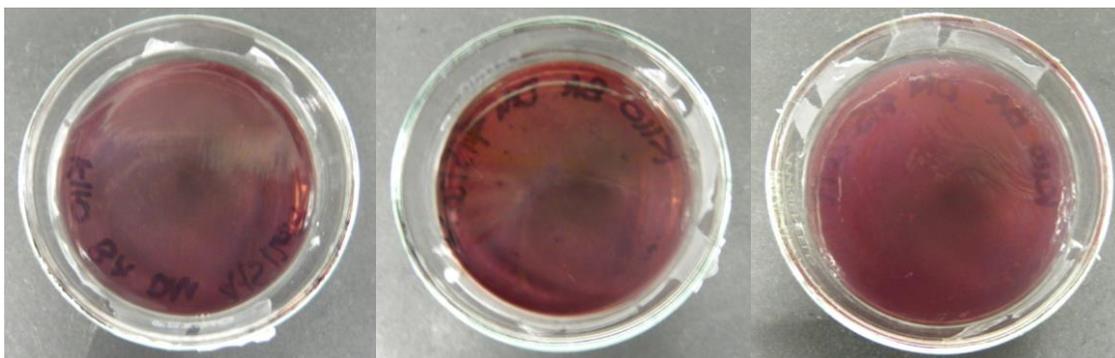
Anexo 57. Crecimiento en agar MacConkey por triplicado para SOTE K105 BR



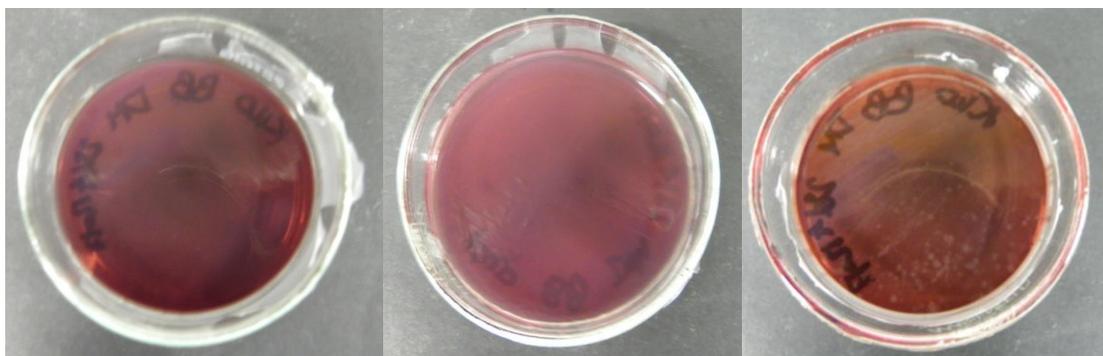
Anexo 58. Crecimiento en agar MacConkey por triplicado para SOTE K105 CA



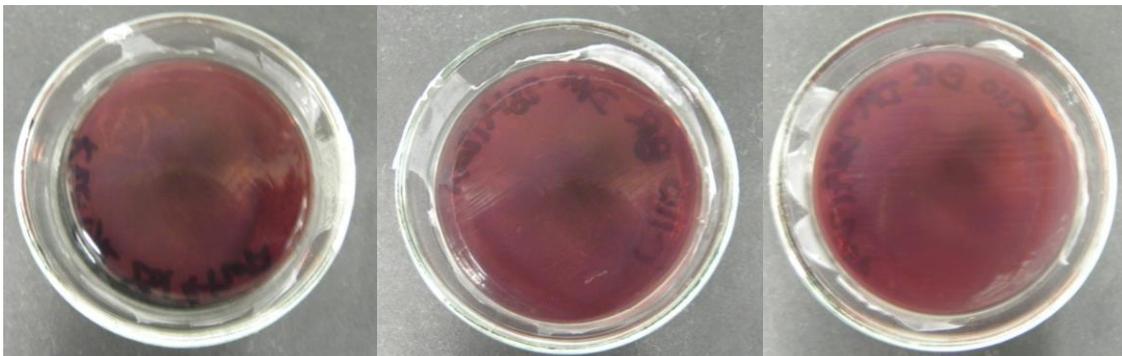
Anexo 59. Crecimiento en agar MacConkey por triplicado para SOTE K110 CA



Anexo 60. Crecimiento en agar MacConkey por triplicado para SOTE K110 CB

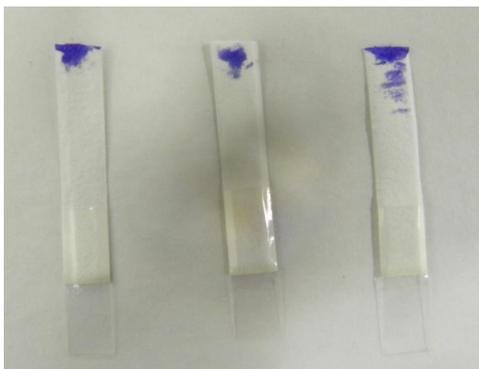


Anexo 61. Crecimiento en agar MacConkey por triplicado para SOTE K110 CR

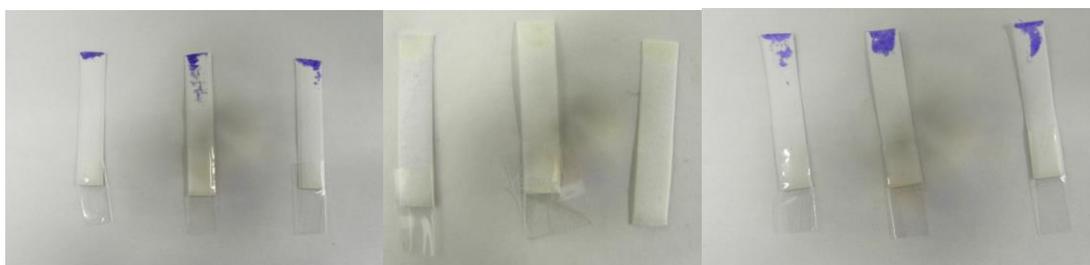


Oxidasa

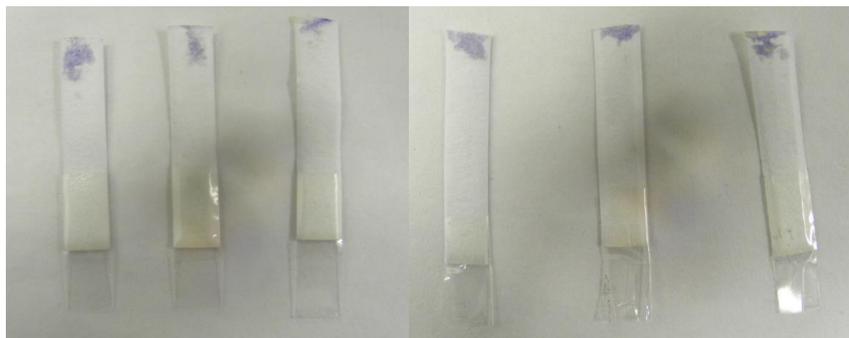
Anexo 62. Prueba oxidasa por triplicado para OSLA K2 (BI)



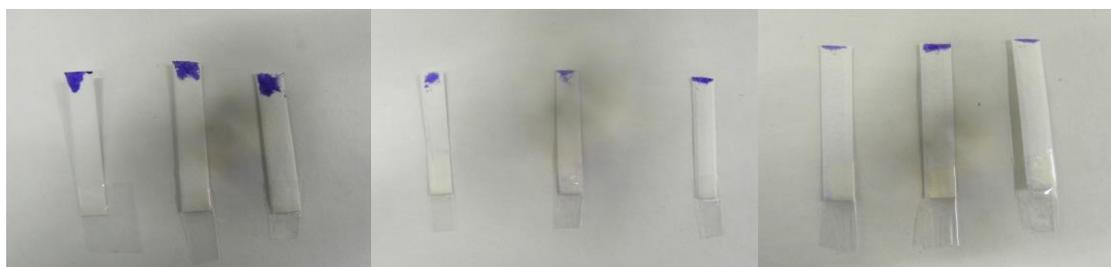
Anexo 63. Prueba oxidasa por triplicado para OSLA K14 (BR, CA y BI)



Anexo 64. Prueba oxidasa por triplicado para SOTE K105 (BR y CA)

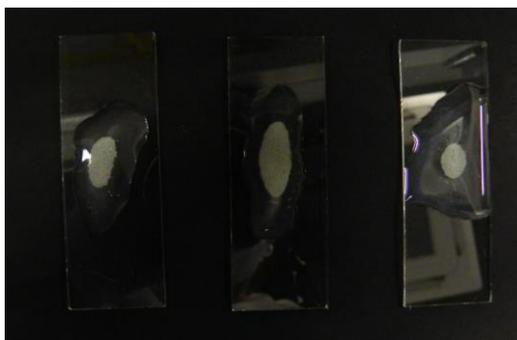


Anexo 65. Prueba oxidasa por triplicado para SOTE K110 (CA, CB y CR)

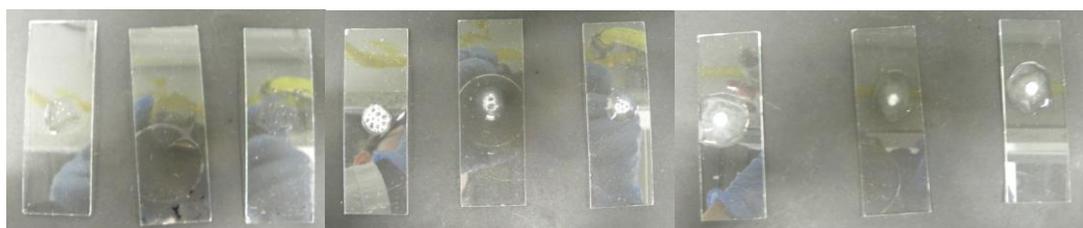


Catalasa

Anexo 66. Prueba catalasa por triplicado para OSLA K2 (BI)



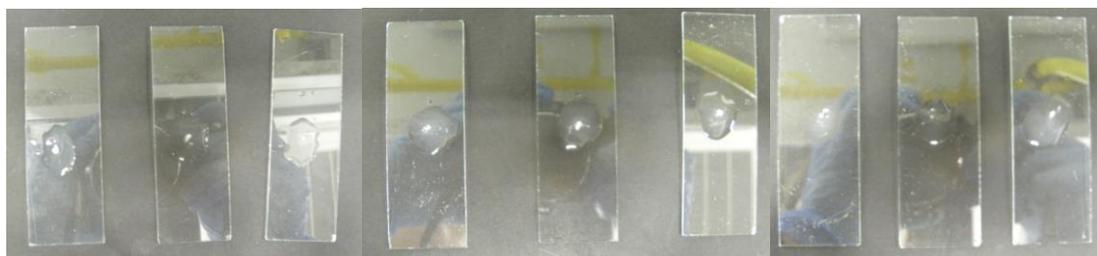
Anexo 67. Prueba catalasa por triplicado para OSLA K14 (BR, CA y BI)



Anexo 68. Prueba catalasa por triplicado para SOTE K105 (BR y CA)

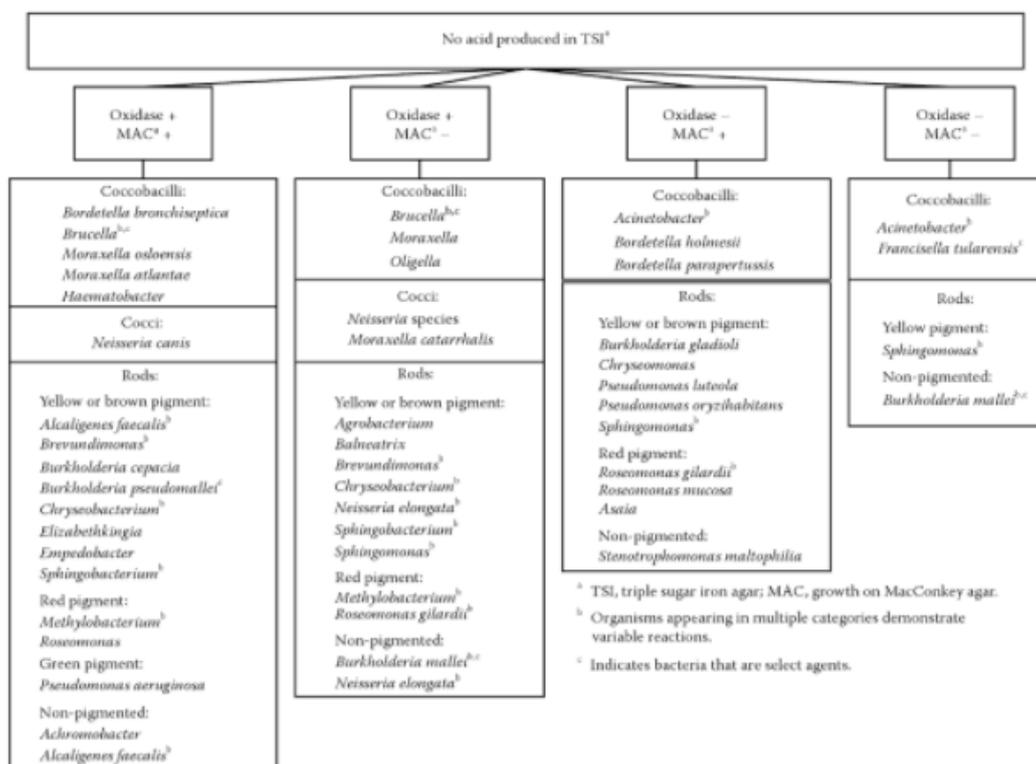


Anexo 69. Prueba catalasa por triplicado para SOTE K110 (CA, CB Y CR)

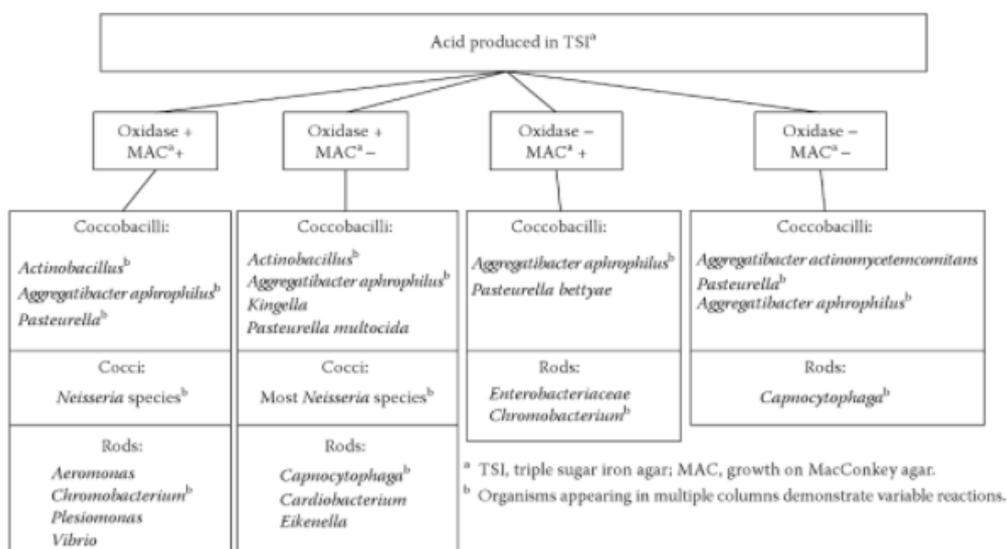


Aproximación sobre los géneros

Anexo 70. Diagrama de identificación de bacterias Gram negativas no productoras de ácido en TSI (Kohlerschmidt *et al.*, 2015, p. 78)

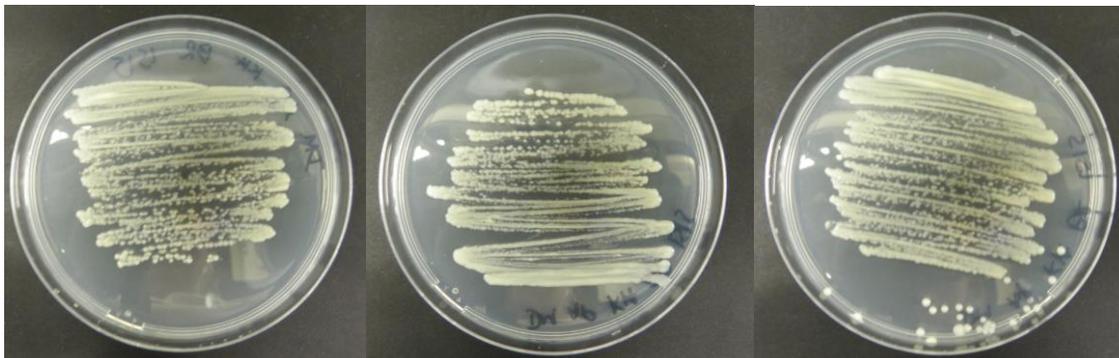


Anexo 71. Diagrama de identificación de bacterias Gram negativas productoras de ácido en TSI (Kohlerschmidt *et al.*, 2015, p. 79)



Determinación del género *Pseudomonas*

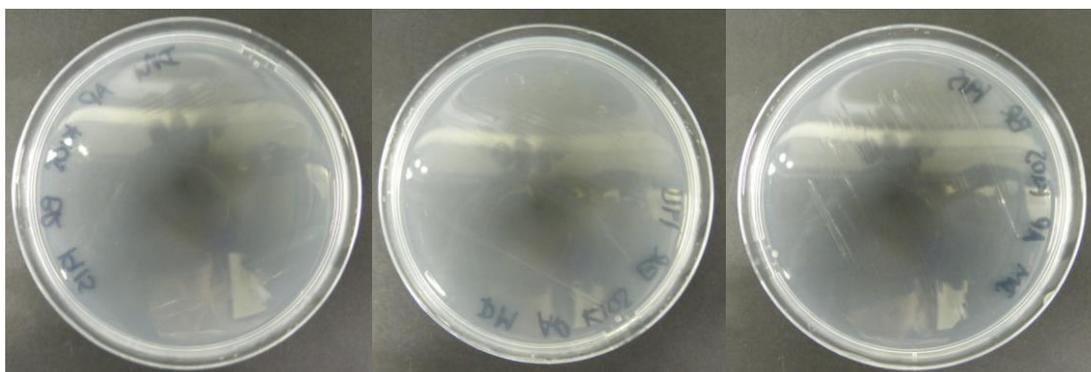
Anexo 72. Crecimiento en agar *Pseudomonas* por triplicado para OSLA K14 BR



Anexo 73. Crecimiento en agar *Pseudomonas* por triplicado para OSLA K14 CA



Anexo 74. Crecimiento en agar *Pseudomonas* por triplicado para SOTE K105 BR



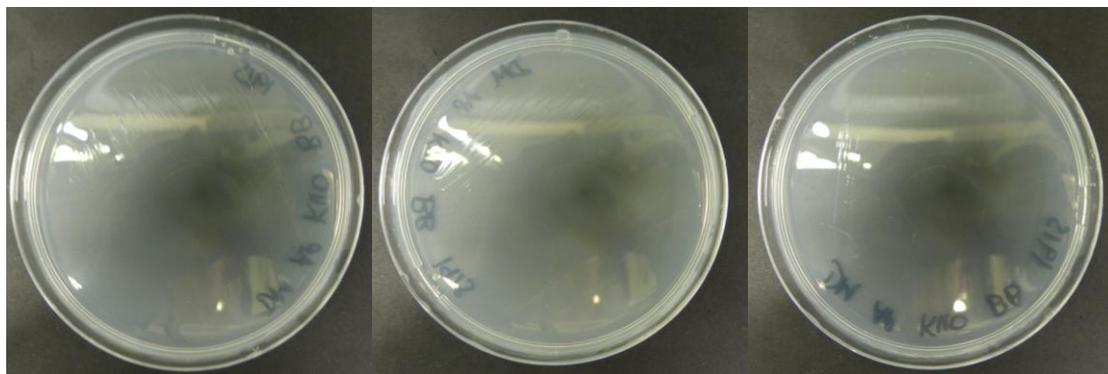
Anexo 75. Crecimiento en agar *Pseudomonas* por triplicado para SOTE K105 CA



Anexo 76. Crecimiento en agar *Pseudomonas* por triplicado para SOTE K110 CA



Anexo 77. Crecimiento en agar *Pseudomonas* por triplicado para SOTE K110 CB



Anexo 78. Crecimiento en agar *Pseudomonas* por triplicado para SOTE K110 CR

