

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS
TOTALES DE PETRÓLEO, A NIVEL DE LABORATORIO,
MEDIANTE CONSORCIOS DE MICROORGANISMOS
SELECCIONADOS POR SU CAPACIDAD
DEGRADADORA, AISLADOS DE SUELOS Y AGUAS
CONTAMINADAS CON CRUDO DE LA PARROQUIA SAN
CARLOS, PROVINCIA DE ORELLANA, BAJO
CONDICIONES AEROBIAS Y ANAEROBIAS.

PREVIA A LA OBTENCIÓN DE GRADO ACADÉMICO O TÍTULO
DE:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

CAROLINA ALEJANDRA SALAZAR RUALES

SANGOLQUÍ, 21 de Octubre de 2010

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Carolina Alejandra Salazar Ruales

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Rafael Vargas

SECRETARIO ACADÉMICO

Dra. Vanessa Andrade

Lugar y fecha: Sangolquí, 21 de Octubre de 2010

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Señorita CAROLINA ALEJANDRA SALAZAR RUALES como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

21 de Octubre de 2010

Fecha

M. Sc. Alma Koch Kaiser
DIRECTORA

Dr. Blanca Naranjo
CODIRECTORA

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis Padres por estar ahí cuando más los necesité; en especial a mi mami por su amor e incondicional apoyo y a mi Alejandro por su cariño, compañía, y ayuda en los momentos más difíciles.

Carolina

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Politécnica del Ejército por permitir el desarrollo de este proyecto de investigación.

A Almita, mi directora de tesis, por brindarme toda su ayuda, apoyo, amistad invaluable y por darme siempre valor y fuerza, sobre todo en los momentos difíciles.

A Blanquita Naranjo, codirectora de mi tesis, por toda su acogida, apoyo y ayuda en el desarrollo de este proyecto y vida universitaria.

Al Dr. Luis Cumbal y al CEINCI por su ayuda y permitirme usar los equipos del laboratorio de Biotecnología Ambiental.

A mi familia por todo su apoyo y preocupación durante la realización de este trabajo investigativo.

A Andrés, Gustavo, Gaby, Majo B., Jessy M. y Rosita por brindarme su ayuda y amistad durante toda la carrera y en especial en el desarrollo de esta tesis.

Y a mis compañeros de laboratorio por la ayuda, amistad y comprensión.

Carolina.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS.....	II
CERTIFICACIÓN	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
LISTADO DE TABLAS.....	X
LISTADO DE FIGURAS	XI
LISTADO DE ANEXOS	XIII
SIGLAS Y ABREVIATURAS	XIV
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XVI
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2 JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	2
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	4
1.3.1 <i>Objetivo General</i>	4
1.3.2 <i>Objetivos específicos</i>	4
1.4 MARCO TEÓRICO	5
1.4.1 <i>Actividad petrolera en el Ecuador</i>	5

1.4.2	<i>Composición del Petróleo</i>	7
1.4.3	<i>Biodegradación y biorremediación</i>	8
1.4.4	<i>Factores que determinan la eficacia de la biorremediación</i>	9
1.4.5	<i>Biodegradación de Hidrocarburos del petróleo</i>	10
1.4.6	<i>Degradación aerobia de hidrocarburos</i>	11
1.4.6	Degradación aerobia de alcanos.....	12
1.4.6	Degradación aerobia de compuestos aromáticos.....	12
1.4.6	<i>Degradación anaerobia de hidrocarburos</i>	13
1.4.7.1	Degradación anaerobia de alcanos.....	13
1.4.7.2	Degradación anaerobia de compuestos aromáticos.....	13
1.4.8	<i>Biodegradación de petróleo por consorcios microbianos.</i>	14
1.5	SISTEMA DE HIPÓTESIS	17
2	CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1	PARTICIPANTES	18
2.1.1	<i>Escuela Politécnica del Ejército</i>	18
2.1.2	<i>Personas</i>	18
2.2	ZONA DE ESTUDIO	18
2.2.1	<i>Campo</i>	18
2.2.2	<i>Laboratorio</i>	19
2.3	PERÍODO DE TIEMPO DE INVESTIGACIÓN.....	19
2.4	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	19
2.5	PROCEDIMIENTOS	22
2.5.1	<i>Muestreo</i>	22
2.5.1.1	Muestras en condiciones aerobias	22
2.5.1.2	Muestras anaerobias	23

2.5.2	<i>Determinación de pH.....</i>	24
2.5.3	<i>Aislamiento de consorcios.....</i>	25
2.5.4	<i>Determinación de microorganismos heterótrofos y degradadores de hidrocarburos.....</i>	27
2.5.4.1	<i>Población bacteriana heterótrofa bajo condiciones aerobias. ...</i>	27
2.5.4.2	<i>Determinación de población bacteriana hidrocarbonoclástica bajo condiciones aerobias.....</i>	28
2.5.4.3	<i>Determinación de hongos totales</i>	29
2.5.4.4	<i>Determinación de hongos degradadores de hidrocarburos.....</i>	29
2.5.4.5	<i>Determinación de población total bajo condiciones anaerobias.</i>	30
2.5.5	<i>Selección de microcosmos con mayor actividad degradadora de TPHs</i>	35
2.5.6	<i>Remoción de TPHs por los microcosmos seleccionados.....</i>	35
2.5.6.1	<i>Microcosmos bajo condiciones aerobias</i>	35
2.5.6.2	<i>Microcosmos bajo condiciones anaerobias</i>	37
2.5.7	<i>Extracción y cuantificación de hidrocarburos totales del petróleo. .</i>	39
2.5.8	<i>Cuantificación de Hidrocarburos Totales del Petróleo por cromatografía de gases.</i>	42
2.6	ANÁLISIS DE DATOS.....	43
3	CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	44
3.1	MUESTREO.....	44
3.2	AISLAMIENTO Y SUBCULTIVO DE CONSORCIOS	45
3.3	DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS HETERÓTROFOS Y DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS.	46
3.3.1	<i>Población heterótrofa bajo condiciones aerobias.....</i>	46

3.3.2	<i>Población hidrocarbonoclástica bajo condiciones aerobias</i>	47
3.3.3	<i>Población sulfato reductora bajo condiciones anaerobias</i>	50
3.4	SELECCIÓN DE MICROCOSMOS CON MAYOR ACTIVIDAD DEGRADADORA DE TPHs	52
3.5	REMOCIÓN DE TPHs POR LOS MICROCOSMOS SELECCIONADOS	53
3.5.1	<i>Tratamientos bajo condiciones aerobias</i>	53
3.5.2	<i>Tratamientos bajo condiciones anaerobias</i>	55
3.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR (DCA)	58
3.6.1	<i>Microcosmos bajo condiciones aerobias</i>	58
3.6.2	<i>Microcosmos bajo condiciones anaerobias</i>	59
4	CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	61
4.1	AISLAMIENTO Y SUBCULTIVOS DE CONSORCIOS	61
4.2	DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS HETERÓTROFOS Y DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS	61
4.3	SELECCIÓN DE MICROCOSMOS CON MAYOR ACTIVIDAD DEGRADADORA DE TPHs	63
4.4	REMOCIÓN DE TPHs POR MICROCOSMOS SELECCIONADOS	64
5	CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	67
6	CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	69
7	CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	70
8	ANEXOS	79

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2. 1 Tratamientos realizados para la evaluación de reducción de TPHs mediante el uso de microcosmos seleccionados en el laboratorio.	21
Tabla 2. 2 Caldo Bushnell-Haas (BH) modificado.	25
Tabla 2. 3 Caldo Luria Bertani (LB) modificado.	26
Tabla 2. 4 Medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos bajo condiciones anaerobias	31
Tabla 2. 5 Solución de oligoelementos para cultivo de microorganismos bajo condiciones anaerobias	34
Tabla 3. 1 Muestras de suelo y agua de la parroquia San Carlos, con sus respectivos valores de pH.	44
Tabla 3. 2 Población de microorganismos heterótrofos y degradadores de hidrocarburos bajo condiciones aerobias.	48
Tabla 3. 3 Población sulfato reductora obtenida de muestras bajo condiciones anaerobias	51
Tabla 3. 4 Análisis de varianza para la concentración final de TPHs de los tratamientos A2, A4, A11 y A13 bajo condiciones aerobias.	58
Tabla 3. 5 Prueba de comparación de medias Tukey para la concentración final de TPHs de los tratamientos A2, A4, A11 y A13 bajo condiciones aerobias	59
Tabla 3. 6 Análisis de varianza para la concentración final de TPHs de los tratamientos N1, N2, N3, N4 bajo condiciones anaerobias.	60
Tabla 3. 7 Prueba de comparación de medias Tukey para la concentración final de TPHs de los tratamientos N1, N2, N3, N4 bajo condiciones anaerobias	60

LISTADO DE FIGURAS

Figura 2. 2 Muestras aerobias de suelo recolectadas en la Parroquia San Carlos.....	23
Figura 2. 3 Muestras anaerobias en medio fluido de tioglicolato recolectadas en la parroquia San Carlos	24
Figura 2. 4 Erlenmeyers con medio BHB, utilizados para el aislamiento de los consorcios microbianos.....	26
Figura 2. 5 Diluciones y siembra de muestras para conteo de microorganismos.....	28
Figura 2. 6 Medio de cultivo anaerobio con tioglicolato.....	32
Figura 2. 7 Cambio de coloración del medio anaerobio.	33
Figura 2. 8 Activación de los microcosmos seleccionados en caldo nutriente.	36
Figura 2. 9 Incubación de los microcosmos en baño María	37
Figura 2. 10 Viales Empleados para el cultivo y degradación de microorganismos anaerobios.	38
Figura 2. 11 Microcosmos anaerobios en cámara de anaerobiosis.	39
Figura 2. 12 Extracción de TPHs con Diclorometano en embudo de vidrio.	40
Figura 2. 13 Extracción de TPHs y equipo de reflujo Soxhlet.	41
Figura 2. 14 Materiales utilizados para el almacenamiento de los TPHs extraídos y concentrados de los microcosmos.	42
Figura 3. 1 Microcosmos aislado en medio de crecimiento LB.	45
Figura 3. 2 Cultivo de microcosmos A4 en medio LB.....	46
Figura 3. 3 Microorganismos heterótrofos bajo condiciones aerobias.	47
Figura 3. 4 UFC heterótrofas e hidrocarbonoclasticas bacterianas y fúngicas de los microcosmos estudiados.	49
Figura 3. 5 Población hidrocarbonoclastica bajo condiciones aerobias.	50
Figura 3. 6 Conteo de poblaciones sulfato reductoras bajo condiciones anaerobias.	51
Figura 3. 7 Población sulfato reductora obtenida de muestras anaerobias.....	52
Figura 3. 8 Cromatograma de tratamientos bajo condiciones aerobias.	53

Figura 3. 9 Concentración de TPHs y eficiencia de remoción de los tratamientos después de 22 días de tratamiento de los microcosmos establecidos.....	54
Figura 3. 10 Tratamientos aerobios después de 22 días de incubación.....	55
Figura 3. 11 Cromatograma de tratamientos anaerobios.....	56
Figura 3. 12 Tratamientos anaerobios después de 22 días de incubación	56
Figura 3. 13 Eficiencia de remoción de los tratamientos	57

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO 1: Tabla del número más probable para series de diluciones en réplicas de cinco por nivel de dilución (Woomer, 1994).....	79
ANEXO 2: Tratamientos bajo condiciones aerobias vs. Tratamiento blanco...	81
ANEXO 3: Cromatogramas de tratamientos bajo condiciones aerobias después de 22 días de incubación.	82
ANEXO 4: Cromatogramas de tratamientos bajo condiciones anaerobias después de 22 días de incubación.....	84

SIGLAS Y ABREVIATURAS

TPHs	Hidrocarburos Totales del Petróleo
DROs	Diesel Range Organics
HAPs	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
DCA	Diseño Completamente al Azar
BH	Bushnell-Haas
LB	Luria Bertani
NMP	Número Más Probable
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
PDA	Papa Dextrosa Agar
PVFD	Polyvinylidene difluoride
ANOVA	Análisis de varianza
EPA	Environmental Protection Agency

RESUMEN

Los resultados que se exhiben en el presente estudio se refieren a la capacidad de la remoción de hidrocarburos totales de petróleo mediante consorcios bajo condiciones aerobias, formados por hongos y bacterias, y microcosmos bajo condiciones anaerobias aislados de suelos y aguas contaminadas con crudo de la Parroquia San Carlos, Provincia de Orellana. La evaluación se realizó a nivel de laboratorio, en dos fases, la primera, fue la selección de los microorganismos por su capacidad degradadora, obteniendo poblaciones hidrocarbonoclasticas bacterianas del 6 al 88% de la población heterótrofa total y poblaciones fúngicas del 8 al 100% de la población total de hongos, mientras que para la selección de microorganismos anaerobios se evaluó las UFC sulfato reductoras. La segunda fase consistió en evaluar la remoción de TPHs por parte de los microcosmos seleccionados bajo condiciones aerobias y anaerobias, alcanzando una eficiencia de bioremediación de 62.31% para el mejor tratamiento aerobio y 36.71% para el mejor tratamiento anaerobio. Si bien los tratamientos aerobios fueron más eficientes en la degradación, en los tratamientos anaerobios se pudo observar una mayor disminución en las bandas de DROS registradas por cromatografía de gases. Los microcosmos seleccionados bajo condiciones aerobias y anaerobias, pueden ser una alternativa de biorremediación para suelos y acuíferos de la Parroquia San Carlos.

ABSTRACT

The results shown in this study refer to the ability of the removal of total petroleum hydrocarbons by consortia, under aerobic conditions, formed by fungi and bacteria, and anaerobes microcosms, isolated from soil and water contaminated with oil from the Parish of San Carlos, Province of Orellana. The evaluation was conducted in the laboratory, in two phases; the first was the selection of microorganisms by degrading capacity, obtaining hydrocarbonoclastic bacterial populations from 6 to 88% of the total heterotrophic population and fungal populations from 8 to 100% of total population of fungi, the selection of anaerobic microorganisms was evaluated by sulphate reducing UFC. The second phase was the evaluation of removal TPH by microcosms selected under aerobic and anaerobic conditions, the bioremoval efficiency was 62.31% for the best aerobic treatment, and 36.71% for the best anaerobic treatment. Although aerobic treatments were more efficient than anaerobic treatments, it was observed that anaerobic microcosm had a greater decrease in peaks of DROS revealed by gas chromatography. The aerobic and anaerobic microcosms selected can be an alternative to soil and water bioremediation of San Carlos Parish.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

Los hidrocarburos son compuestos naturales que se presentan en el medio ambiente y son reconocidos como contaminantes desde los inicios de la vida del hombre, cuando se depositan en lugares no apropiados; sin embargo, en el mundo se ejerce una gran presión en la producción de energía, provocando un uso excesivo del petróleo y sus derivados (Briseño *et al.*, 2003).

Los componentes y derivados del petróleo son considerados elementos muy recalcitrantes, lo que representa una problemática para la degradación de los mismos por parte de los microorganismos, ocasionando que estos elementos persistan por prolongados periodos de tiempo dentro de los ecosistemas, principalmente debido a su naturaleza hidrofóbica y baja volatilidad, por lo que es necesario implementar un sistema que incluya diversidad microbiana capaz de degradar varios tipos de hidrocarburos (Abed *et al.*, 2002).

Ecuador es un país petrolero y minero, donde se presentan problemas de contaminación de ecosistemas frágiles y de áreas agrícolas, requiriendo de una investigación destinada al desarrollo de técnicas biocorrectoras adaptadas a las condiciones ecológicas de la nación.

En el país se han realizado trabajos de biorremediación de suelos, sin embargo, la remediación de acuíferos no ha sido reportada. La universidad Católica del Ecuador reportó en el año 2000, una remediación exitosa recuperando 35 sitios contaminados de la amazonia, gracias a este trabajo se puede verificar que la biorremediación, aún de larga duración, alcanza costos de limpieza más bajos (Vanneck, 2000), sin embargo la mayoría de estudios

realizados en nuestro país reportan biorremediación utilizando cepas bacterianas puras y es de conocimiento científico que hoy en día se alcanza una mayor degradación de hidrocarburos aromáticos mediante el uso de microorganismos en cultivos cometabólicos o también denominados consorcios (Arp *et al.*, 2001).

Se evalúa que en el ecosistema amazónico han sido derramados más de 60 millones de galones de crudo y, vertidos más de 42.000 millones de galones de aguas de formación con alto nivel de toxicidad (Mendoza, 2008).

En el Ecuador se presenta una grave situación provocada por las fosas petroleras y su impacto ambiental, lo que conlleva a la búsqueda de posibles alternativas mediante el empleo de cultivos mixtos de microorganismos autóctonos bajo condiciones aerobias y anaerobias, para la biodegradación de desechos petrolizados y biorremediación de ambientes contaminados.

1.2 Justificación del problema

Ecuador presenta problemas de contaminación de ecosistemas frágiles y de áreas agrícolas provocando concentraciones que sobrepasan los límites permisibles de hidrocarburos totales establecidos en el Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador, $<1000 \text{ mgKg}^{-1}$, requiriendo de una investigación destinada al desarrollo y mejoramiento de técnicas aplicables a la biorremediación de estos ambientes. La actividad de los microorganismos tiene lugar dentro de un gran rango de condiciones ambientales llegando a notar un crecimiento abundante en zonas contaminadas por crudo o sus derivados, lo que sugiere que juegan un rol importante en la limpieza de los ambientes contaminados (Abed y Koster, 2005).

La elevada complejidad de la composición del crudo de petróleo crudo y derivados, implica la existencia de una amplia capacidad enzimática si se quiere conseguir una degradación significativa de este material. La mayor parte de los estudios realizados se han llevado a cabo con cepas bacterianas aisladas individualmente. En la mayoría de los casos, son degradadoras de alcanos, debido a que los alcanos son los componentes más abundantes del crudo de petróleo. No obstante en algunos casos, estas cepas tienen la capacidad de oxidar selectivamente las cadenas alquílicas de ciertos HAPs alquilados, compuestos abundantes en el crudo, pero si existiera la presencia de estos dos tipos de microorganismos se podría alcanzar la degradación de alcanos y HAPs al mismo tiempo (Valderrama, 2004).

Teniendo en cuenta la diversidad de los hidrocarburos petroleros, sean compuesto simple o mezcla de los mismos, se requiere más de una especie microbiana para la degradación eficiente de los contaminantes iniciales, manifestándose así poblaciones primarias, encargadas del primer paso degradativo, para dar cabida a poblaciones secundarias encargadas de digerir y evitar la acumulación de los productos metabólicos de la población anterior, ya que la acumulación de estos implica un descenso en la capacidad degradativa de los consorcios microbianos (Rojas, 2005).

Las bacterias y hongos autóctonos aerobios metabolizan fácilmente contaminantes de hidrocarburos. El uso de la respiración aeróbica permite que los microorganismos aerobios degraden eficazmente una amplia gama de compuestos presentes en los combustibles y otros derivados del petróleo. Sin embargo, los niveles de hidrocarburos presentados por los derrames son típicamente muy por encima de los niveles de oxígeno disuelto necesario para apoyar su degradación. Por lo tanto, agotan el oxígeno los organismos aeróbicos y de ese modo transforman el entorno del acuífero de aeróbico a anaeróbico (Vroblesky y Chapell, 1994; Anderson & Lovley 1997; Lovley, 1997).

Por lo mencionado en el párrafo anterior, surge la necesidad de remediar ambientes, transformados en anaerobios, utilizando microorganismos capaces de degradar compuestos contaminantes en ausencia de oxígeno.

En el presente proyecto se emplean microcosmos bajo condiciones aerobias, integrado por hongos y bacterias asociadas autóctonas, y microcosmos, bajo condiciones anaerobias, provenientes de los suelos y aguas contaminadas con hidrocarburos de la Provincia de Orellana, para la degradación del crudo; lo cual servirá como un estudio de factibilidad encaminado a determinar la eficiencia de remoción del crudo por acción microbiana, en microcosmos construidos en el laboratorio.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

Evaluar la remoción de hidrocarburos totales de petróleo, a nivel de laboratorio, mediante consorcios de microorganismos seleccionados por su capacidad degradadora, aislados de suelos y aguas contaminadas con crudo de la Parroquia San Carlos, Provincia de Orellana, bajo condiciones aerobias y anaerobias.

1.3.2 Objetivos específicos

- Aislar y producir biomasa conformadora de microcosmos autóctonos, provenientes de los suelos y aguas contaminadas con hidrocarburos de la Provincia de Orellana, para la degradación del crudo, bajo condiciones de laboratorio.

- Cuantificar los microorganismos heterótrofos y degradadores de hidrocarburos para formar los consorcios que degradarán TPHs

- Seleccionar los microcosmos con mayor cantidad de microorganismos hidrocarbonoclasticos para la elaboración del ensayo de remoción de TPHs.
- Estudiar la eficiencia de remoción del crudo por acción de los microcosmos seleccionados en el laboratorio, mediante evaluación de TPHs en condiciones de tiempo inicial y final.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Actividad petrolera en el Ecuador.

Hoy en día la industria petrolera juega un rol determinante en la vida de muchos países, a tal punto que anualmente se extraen y procesan cientos de miles de toneladas de crudo provenientes de yacimientos subterráneos. La mayor parte del crudo extraído es empelado como combustible (gasolina y diesel, entre otros); así mismo ciertas fracciones volátiles (metano, propano y butano), parte de esta extracción también se emplea en la producción de otros compuestos (principalmente plásticos) dejando las fracciones más pesadas y menos valiosas para la elaboración de pavimentos (Valderrama, 2004).

El hecho de que en la actualidad se empleen en gran medida a los combustibles fósiles trae como consecuencia directa un alto grado de contaminación y la aparición de marcados cambios ambientales. En parte, esta contaminación producto del uso del petróleo ocasiona un deterioro de la calidad del medio ambiente, representando una amenaza real, así como la extinción de gran cantidad de especies vegetales y animales (Valderrama, 2004).

Durante la operación de las actividades petroleras es común el derrame de combustibles como la gasolina, las pérdidas en tanques y tuberías debidas a fugas, derrames accidentales y tomas clandestinas que han causado

problemas ambientales en grandes extensiones de suelo superficial y de capas a nivel más profundo. Cuando los combustibles han penetrado en el suelo, se convierten en un problema para la vida de los organismos, como consecuencia de su migración y contacto con los mantos freáticos. Por otra parte, los combustibles también pueden afectar la estructura, fertilidad y productividad del suelo (Langewiesche, 2007).

En la etapa de exploración sísmica y búsqueda de petróleo se abren trochas donde se deforesta causando erosión de suelos, sedimentación de ríos y pérdida de biodiversidad, se ahuyentan los animales y mueren los peces con las detonaciones. En la etapa posterior a la perforación los desechos tóxicos se depositan en piscinas sin recubrimiento al lado de los pozos, muchas veces los desechos salen de ahí a los ríos y esteros, con lo que se contaminan el agua, además los campamentos petroleros también contaminan con aguas servidas (Oilwatch.org, 2005).

El primer descubrimiento importante de petróleo, lo realizó la compañía Angla Ecuadorian Oilfields Ltda. En 1924 en la península de Santa Elena, dando inicio a la producción petrolera en 1925 con 1 226 barriles diarios, esta producción fue declinando hasta que en la actualidad se extraen apenas 835 barriles diarios. Los primeros trabajos de exploración hidrocarburífera en la Región Oriental se inician en 1921, cuando la compañía Leonard Exploration Co. de Nueva York obtuvo una concesión de veinte y cinco mil Km² por el lapso de 50 años. En 1937 la compañía Shell logra 10 millones de hectáreas en concesión en la región del nororiente, para luego devolverlas argumentando que no existía petróleo. En 1964 la Texaco Gulf obtiene una concesión de 1'500.000 ha. Esta compañía en 1967 perfora el primer pozo productivo el Lago Agrio N°1. Posteriormente en 1969 siguieron los de Sacha y Shushufindi. A raíz de este encuentro, se produce una feria de concesiones, que tuvieron como efecto consolidar el dominio absoluto de las compañías extranjeras, ya que mantenían el control de más de cuatro millones de hectáreas. La

producción propiamente de la Región Oriental se inicia en 1972 por parte del consorcio Texaco-Gulf (Martinez, 2007).

En el Ecuador, la compañía Texaco perforó aproximadamente 325 pozos productivos y construyó 18 estaciones procesadoras de crudo, dando un total de más de 340 localidades donde los desechos fueron almacenados o desechados a las cuencas de los ríos. En más de 17 años que Texaco operó el oleoducto, hasta que Petroecuador asumió el control, este sufrió 27 de las mayores rupturas derramándose cerca de 17 millones de galones de petróleo, mucho de lo cual aún no ha sido limpiado. El volumen de los derrames ha sido ampliamente reportado, Exxon Valdez derramó 11 millones de galones (Langewiesche, 2007).

El 49% de las familias que viven cerca de las instalaciones petroleras han sufrido algún tipo de accidente que ha comprometido su salud por efecto de baños en aguas contaminadas, intoxicaciones por gas, caídas a piscinas con crudo, quema de productos de petróleo, contacto con químicos, explosiones de pozos, ruptura de oleoductos, consumo de alimentos intoxicados (Mendoza, 2008).

1.4.2 Composición del Petróleo

El crudo de petróleo se caracteriza por ser un líquido negro, viscoso y con una composición química sumamente compleja, pudiendo contener miles de compuestos, básicamente de la familia de los hidrocarburos. Los hidrocarburos constituyen un 50-98% de la composición, por lo que son los contaminantes ambientales más importantes, tanto por su abundancia, como por su persistencia en distintos compartimentos ambientales. Mayoritariamente son alcanos de cadena lineal (n-alcanos o nparafinas), alcanos ramificados (en

menor cantidad), cicloalcanos (o naftenos) y cantidades variables de hidrocarburos aromáticos (Bozo *et al.*, 2007).

La composición elemental de un crudo está condicionada por la predominancia de los compuestos tipo hidrocarburo: 84-87% de C, 11-14% de H, de 0-8% de S y de 0-4% de O y N; y, metales como el níquel. Los principales componentes se subdividen y purifican en distintas fracciones:

- i) *fracción saturada*: comprenden n-alcanos, alcanos ramificados con cadenas alquílicas y las cicloparafinas
- ii) *fracción aromática*: son moléculas aromáticas simples como monoaromáticos, diaromáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs),
- iii) *fracción de resinas*: son sólidos polares, amorfos disueltos que contienen nitrógeno, azufre y oxígeno.
- iv) *fracción de asfaltenos*: que son menos abundantes y consisten en compuestos más polares, pudiéndose encontrar hidrocarburos heterocíclicos, hidrocarburos oxigenados y agregados de alto peso molecular (Viñas, 2005).

1.4.3 Biodegradación y biorremediación

La Biodegradación es el resultado de los procesos de digestión, asimilación y metabolización de un compuesto orgánico llevado a cabo por bacterias, hongos, protozoos y otros organismos. En principio, todo compuesto sintetizado biológicamente puede ser descompuesto biológicamente.

La biodegradación es un proceso natural, ventajosa no sólo por permitir la eliminación de compuestos nocivos impidiendo su concentración, sino que además es indispensable para el reciclaje de los elementos en la biosfera, permitiendo la restitución de elementos esenciales en la formación y

crecimiento de los organismos (carbohidratos, lípidos, proteínas). La descomposición puede llevarse a cabo en presencia de oxígeno (aeróbica) o en su ausencia (anaeróbica). La primera es más completa y libera energía, dióxido de carbono y agua, es la de mayor rendimiento energético. Los procesos anaeróbicos son oxidaciones incompletas y liberan menor cantidad de energía (Branco, 1984).

En la biorremediación intervienen organismos vivos para reducir o eliminar riesgos medioambientales resultantes de la acumulación de compuestos químicos tóxicos y otros residuos peligrosos.

El uso de tecnologías de biorremediación para el tratamiento de sitios contaminados es una opción que presenta ventajas con respecto a los métodos físicos y químicos, puesto que son sencillas de implementar. Por otro lado, también son efectivas y ambientalmente seguras, ya que los contaminantes se destruyen o transforman, sin requerir en la mayoría de los casos, tratamientos adicionales; representando tecnologías considerablemente económicas (Volke y Velasco, 2003).

1.4.4 Factores que determinan la eficacia de la biorremediación

I) Propiedades del contaminante: básicamente se refiere a su biodegradabilidad. Por ejemplo, si es petróleo, los hidrocarburos lineales se degradan más rápidamente que los ramificados. La presencia de dobles enlaces, anillos aromáticos y diversas sustituciones químicas hacen una molécula más resistente a su biodegradación

II) Presencia de comunidades microbianas adecuadas: los microorganismos pueden ser autóctonos (biorremediación intrínseca, atenuación natural) o añadidos al sistema para mejorar la degradación (bioaumentación).

III) Disponibilidad del contaminante: es un factor crítico, tan importante como la presencia de comunidades microbianas adecuadas. Depende de su solubilidad, estado de oxidación, adsorción a componentes del suelo.

IV) Naturaleza del medio contaminado: puede afectar al crecimiento microbiano y al metabolismo del compuesto en cuestión. Por ejemplo, permeabilidad, temperatura, presencia o ausencia de nutrientes orgánicos, oxígeno u otros aceptores de electrones, pH, etc.

V) Toxicidad: la toxicidad de un compuesto afecta a la capacidad de un organismo para asimilarlo (Branco *et al.*, 2005).

1.4.5 Biodegradación de Hidrocarburos del petróleo

En la biorremediación se emplean organismos vivos (plantas, hongos y bacterias, entre otros) que tienen ciertas actividades catabólicas que los hacen factibles el uso de los contaminantes como fuente de alimento y energía, llevando a una mineralización a través de la degradación parcial o total de moléculas orgánicas hasta compuestos inorgánicos y componentes celulares (Volke y Velasco, 2003).

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que en la cadena respiratoria o transportadora de electrones de las células, se van a producir una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía. La cadena la inicia un sustrato orgánico que es externo a la célula, como lo pueden ser los compuestos hidrocarburos y que actúan como donadores de electrones, lo que tiene como resultado final una actividad metabólica que es capaz de degradar y consumir dichos compuestos (Arroyo y Quesada, 2002).

Dentro de la mayoría de los microorganismos, los aceptores más comúnmente utilizados por estos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los

sulfatos y el dióxido de carbono. La respiración microbiana se produce en condiciones aerobias cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones y, los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias y, los procesos de biodegradación serán de tipo anaeróbico (Arroyo y Quesada, 2002).

1.4.6 Degradación aerobia de hidrocarburos

Los microorganismos que utilizan hidrocarburos como sustrato deben tener enzimas denominadas monooxigenasas que son dependientes de oxígeno. La mayoría de los microorganismos en teoría que son capaces de sobrevivir en ese ambiente pueden degradar sin problemas hidrocarburos de cadena larga. Para que los microorganismos puedan degradar alcanos primero deben oxidar con oxígeno el último carbono de la molécula gracias al complejo multienzimático que no hacen más que incorporar esta molécula de oxígeno, de esta manera se obtiene un hidrocarburo con un grupo alcohol constituyendo una molécula mas reactiva. Mediante otras enzimas el grupo alcohol se oxida hasta aldehído y finalmente ácido carboxílico. Así se obtiene una molécula similar a un ácido graso y puede ser degradado a acetil-CoA por β -oxidación. Este proceso de oxidación también puede darse en carbonos no terminales por rupturas de cadenas grandes de carbonos, dando lugar a dos ácidos grasos que se procesarán por β -oxidación (Van Beilen *et al.*, 2003).

Aunque la mayoría de microorganismos, en teoría, sean capaces de utilizar este mecanismo, pocos pueden vivir en esas condiciones. Para hacerlo, deben ser capaces de vivir en un medio muy hidrófobo como es el petróleo. Por lo tanto, para colonizar las interfases petróleo-agua tienen que variar sustentablemente la membrana. Además para introducir los hidrocarburos en la célula lo hacen vía vesícula. Por lo tanto, si hablamos de requerimientos genéticos no solo es necesario el sistema monooxigenasa sino otros genes que permitan variar la envoltura y formación de esas vesículas. Por esta razón

son pocos las especies que pueden realizar esta biodegradación (Van Hamme *et al.*, 2003).

1.4.6.1 Degradación aerobia de alcanos

En la inmensa mayoría de los casos, los microorganismos metabolizan los alcanos transformándolos en ácidos grasos mediante la oxidación progresiva de uno de los grupos metilo terminal. Realmente la enzima clave es la primera, la alcanohidroxilasa, que adiciona un grupo alcohol en dicho carbono. Es una, monooxigenasa (a partir de O₂ adiciona un átomo de oxígeno en dicho átomo de C y, el otro átomo de O es reducido a agua). Las demás enzimas que participan son más habituales (Torres *et al.*, 2009).

1.4.6.2 Degradación aerobia de compuestos aromáticos

Los anillos aromáticos son químicamente muy estables debido a su peculiar estructura electrónica. Sin embargo, algunos microorganismos han desarrollado estrategias para desestabilizar dicha estructura electrónica y romper el anillo. En condiciones aeróbicas, básicamente el proceso consiste en la introducción de uno o dos grupos – OH mediante monooxigenasas o dioxigenasas (realmente hacen falta dos grupos OH, así que sólo se introduce uno cuando ya está uno presente como es el caso del fenol). La estructura resultante es menos estable (ahora presenta dos dobles enlaces permanentes en vez de los tres oscilantes previos) y es atacada por una segunda dioxigenasa que abre el anillo y genera un compuesto que puede ser metabolizado mediante el ciclo de Krebs. Hay dioxigenasas que abren el anillo en la posición orto (entre los C 1 y 2) y otras que lo hacen en la posición meta (entre los C 2 y 3) según Torres *et al.*, 2009.

1.4.7 Degradación anaerobia de hidrocarburos

Desde finales de 1980, un número creciente de nuevos microorganismos han demostrado que utilizan los hidrocarburos saturados y aromáticos en su crecimiento como sustratos bajo estrictas condiciones de anoxia. Estos microorganismos utilizan el hierro, nitrato o sulfato como aceptor de electrones para la respiración anaerobia, crecen en cocultivos microbianos con otros anaerobios. Se conocen varios microorganismos capaces de degradar anaeróbicamente hidrocarburos, si bien las rutas no están totalmente caracterizadas. Estas rutas tienen mucha importancia en el ciclo del carbono. La degradación anaeróbica es un proceso más lento que la aeróbica. Además de otras estrategias para las oxidaciones iniciales, requieren aceptores finales de electrones distintos del oxígeno: menos energía, es decir, velocidad de crecimiento y de asimilación más lenta (Van Hamme *et al.*, 2003).

1.4.7.1 Degradación anaerobia de alcanos

Se ha visto este tipo de degradación en dos tipos de bacterias, sulfato reductoras y desnitrificantes (nitrato-reductora). Al parecer el mecanismo de activación del alcano implica la adición de una molécula de fumarato, de modo que se forma un diácido que probablemente es metabolizado por la vía de oxidación de los ácidos grasos (Torres *et al.*, 2009).

1.4.7.2 Degradación anaerobia de compuestos aromáticos

Las rutas mejor caracterizadas, como la del tolueno de diversas bacterias sulfato reductoras y desnitrificantes, también implican la adición de un fumarato al tolueno, seguido de la activación con el CoA. Tras una serie de pasos adicionales se forma una molécula de benzoil-CoA que ya es susceptible

de perder la aromaticidad mediante procesos de reducción que eliminan dos de los tres dobles enlaces de la molécula (Torres *et al.*, 2009).

1.4.8 Biodegradación de petróleo por consorcios microbianos.

Los hidrocarburos suelen presentarse en mezclas muy complejas, implicando que la biorremediación de los mismos involucre ciertas comunidades de microorganismos (Greene *et al.*, 2000) las cuales para llegar a tal fin sufren marcadas sucesiones microbianas (Rojas, 2005).

La diversidad metabólica de las bacterias es un hecho establecido y, como consecuencia de la misma, está la capacidad de degradación de un variado grupo de contaminantes o compuestos antropogénicos recalcitrantes, a través de las actividades microbianas (Manab *et al.*, 2004).

En el ambiente, los hidrocarburos llegan a ser biodegradados inicialmente por las bacterias y los hongos. Se sabe que los organismos en su acción individual son capaces solo de llegar a metabolizar ciertas fracciones del crudo, así que las poblaciones mixtas con capacidades enzimáticas amplias, son requeridas para degradar tales mezclas complejas tanto en ambientes de suelo, aguas dulces o marinas (Leahy y Colwell, 1990).

En la biodegradación de hidrocarburos por cultivos mixtos de bacterias se presentan dos posibilidades, las cuales pueden ser la utilización de consorcios definidos y consorcios no definidos, siendo los definidos aquellos formados por una combinación de cepas aisladas con capacidades degradativas conocidas que son complementarias entre sí (Viñas, 2005).

A diferencia de los consorcios definidos, los no definidos son el producto de la selección natural que ha tenido lugar en ambientes previamente

contaminados por hidrocarburos y, por ende, la comunidad microbiana está presente en el ambiente debido a su cooperación metabólica en la degradación de los contaminantes. Este factor de selección natural sugiere que los microorganismos presentes sean degradadores de los productos finales que se acumulan como resultado de procesos cometabólicos (Viñas, 2005).

Estudios anteriores se han abocado al análisis de las capacidades degradativas de las comunidades microbianas (en conjunto y aisladas) propias de suelos contaminados. Jonson *et al.*, (1972) tomaron cultivos puros y mixtos de cepas bacterianas provenientes de suelos contaminados con hidrocarburos, y los sometieron a dos tipos de crudo de diferente calidad a diferentes temperaturas 4°C y 30°C, obteniendo que en ambos crudos y temperaturas, la fracción saturada fue preferencialmente usada por las bacterias. También, se evidenció el aprovechamiento de las fracciones aromáticas por parte de las bacterias.

Lopolito *et al* (1996) evaluaron y compararon la capacidad de biodegradación de hidrocarburos y compuestos relacionados de tres inóculos diferentes desarrollados a partir de: 1) una muestra de agua superficial con alto grado de contaminación y, 2) de reactores "batch" alimentados con crudo de petróleo y aceite, concluyendo que los microorganismos capaces de degradar estos compuestos están presentes en el mismo sustrato, pero en cantidades mínimas llevando a una degradación más retardada en comparación a la ocurrida en los tratamientos con inoculación provenientes de reactores "batch".

Otro estudio en el que se aplica la técnica de biorremediación *in situ* a través de consorcios bacterianos, es el realizado por López *et al* (2006) quienes condujeron un tratamiento en Long Beach (California, Estados Unidos) aplicando bacterias autóctonas del suelo contaminado logrando la remoción de contaminantes petroleros.

Los contaminantes de carácter orgánico, provenientes del crudo, encontrados en ambientes naturales o artificiales, pueden ser atacados para su biotransformación y biodegradación por la acción de diversas cepas fúngicas. Los hongos son los encargados de proveer nutrientes asimilables por las bacterias presentes en los ecosistemas contaminados con hidrocarburos (Ferrera *et al.*, 2006), actuando también en la remoción de nutrientes, metales pesados y patógenos (Muñoz y Guieysse, 2006), lo que incrementa el potencial de degradación y eliminación de contaminantes, por parte de estas comunidades microbianas (Ferrera *et al.*, 2006).

La interacción bacterias-hongos en el potencial para la biorremediación no está limitada únicamente a los aspectos antes mencionados, estos también mantienen una interacción de intercambio de CO_2 / O_2 . Las bacterias son capaces de incrementar el pH del medio, la concentración de oxígeno disuelto, la temperatura del medio o de la excreción de metabolitos inhibitorios o estimulantes para el propio desarrollo microbiano, además de liberar al medio factores promotores del crecimiento para hongos o metabolitos extracelulares (Ferrera *et al.*, 2006).

Abed *et al* (2004) en su estudio sobre el rol de las bacterias heterotróficas asociadas con hongos en la degradación de componentes del crudo, indican que son las bacterias y no los hongos, las responsables de la degradación. No obstante, estos últimos juegan un papel muy importante, pero indirecto en la biorremediación, al potenciar el crecimiento y la actividad de las bacterias.

Las interacciones entre las distintas comunidades microbianas han sido estudiadas por Safonova *et al* (1999), dejando de manifiesto que las bacterias alcanotróficas tienen la capacidad de poder restaurar la capacidad reproductiva en hongos sensibles a la presencia del crudo, así como también, en la estimulación del crecimiento celular en aquellos que de por sí son tolerantes.

Entre los aspectos que son estudiados en los cultivos de hongos y bacterias están los efectos de los productos (azúcares, lípidos y aminoácidos) resultantes de la biodegradación del petróleo por bacterias y sus efectos sobre el crecimiento fúngico.

Entre los microorganismos se presentan interrelaciones que tienen lugar en todos los ambientes, incluyendo aquellos que han sufrido derrames de hidrocarburos. Las complejas comunidades que desarrollan los microorganismos tienen una organización estratificada en los sustratos donde se ubican dependiendo de los abruptos gradientes de luz, oxígeno, ácido sulfúrico y potencial redox que se genera y, de su propia fisiología. Las capas superficiales consisten en poblaciones fototróficas oxigénicas, de cianobacterias y algas eucariotas, principalmente. En dichas laminaciones, las bacterias heterotróficas consumen materia orgánica y oxígeno. Por debajo de éstas, si las condiciones son adecuadas, se sitúan las capas anaerobias dominadas por bacterias heterotróficas (Martínez *et al.*, 2005).

1.5 Sistema de hipótesis

Los consorcios aerobios y anaerobios de microorganismos seleccionados de suelos y aguas contaminadas con crudo de la Parroquia San Carlos, Provincia de Orellana, son capaces de remover Hidrocarburos Totales del Petróleo a nivel de laboratorio, bajo condiciones aerobias y anaerobias

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

2.1.1 Escuela Politécnica del Ejército

En el Departamento de Ciencias de la Vida, Carrera de Ingeniería en Biotecnología y, el Centro de Investigaciones Científicas (CEINCI), se realizaron las distintas actividades que permitieron el desarrollo de la investigación.

2.1.2 Personas

M. Sc. Alma Koch, como directora y, Dra. Blanca Naranjo, como co-directora de tesis, participaron en el desarrollo científico de esta investigación, mediante la orientación en el laboratorio, campo y trabajo final.

2.2 Zona de Estudio

2.2.1 Campo

Las muestras de suelos y aguas fueron obtenidas del nor-orienté de la región amazónica: provincia de Orellana en el sector de “La Joya de los Sachas -San Carlos”, con coordenadas entre los meridianos $76^{\circ} 52' 300''$, $76^{\circ} 53' 1''$ y los paralelos $0^{\circ} 22' 20''$, $0^{\circ} 22' 45''$.

2.2.2 Laboratorio

Los análisis de laboratorio se realizaron en su totalidad en los Laboratorios de Microbiología y Biotecnología Ambiental del Centro de Investigaciones Científicas de la Escuela Politécnica del Ejército.

2.3 Período de tiempo de investigación

El trabajo fue realizado entre los meses de Agosto de 2009 y Junio de 2010.

2.4 Diseño Experimental

La selección de los consorcios de microorganismos aerobios con mayor actividad de degradación de hidrocarburos se realizó cuantitativamente, mediante el mayor número de colonias hidrocarbonoclasticas obtenidas por medio de la técnica del número más probable descrita por Fernández, (2006) para los microcosmos bajo condiciones aerobias y anaerobias, mientras que la selección de los microcosmos anaerobios se realizó mediante la mayor población de microorganismos anaerobios representadas por el oscurecimiento y precipitación del medio fluido de tioglicolato de los microorganismos anaerobios (Fernández., 2006).

Los datos recogidos de la investigación fueron de carácter cuantitativo expresados como porcentaje (%) de reducción de la concentración de TPHs de los tratamientos en comparación con un tratamiento blanco; analizados mediante un Diseño Completamente al Azar (DCA) con cuatro tratamientos para microcosmos bajo condiciones aerobias y anaerobias y, tres repeticiones para cada uno de ellos, como se detalla en la Tabla 2.1. realizándose también, pruebas de comparación de medias de Duncan. Los diseños experimentales y

análisis estadísticos fueron realizados de acuerdo a lo establecido por Gutiérrez (2008). Los datos fueron analizados mediante el programa SPSS 15.

Tabla 2. 1 Tratamientos realizados para la evaluación de reducción de TPHs mediante el uso de microcosmos seleccionados en el laboratorio.

Número	Tratamiento	Repeticiones	Descripción
1	TB	3	100 mL de Medio Mineral + 0,5% (v/v) de petróleo sin inóculo (control aerobio)
2	T1	3	100 mL de Medio Mineral + 0,5% (v/v) de petróleo + inóculo aerobio 1
3	T2	3	100 mL de Medio Mineral + 0,5% (v/v) de petróleo + inóculo aerobio 2
4	T3	3	100 mL de Medio Mineral + 0,5% (v/v) de petróleo + inóculo aerobio 3
5	T4	3	100 mL de Medio Mineral + 0,5% (v/v) de petróleo + inóculo aerobio 4
6	TC	3	100 mL de Medio Mineral + 0,5% (v/v) de petróleo sin inóculo (control anaerobio)
7	T6	3	100 mL de Medio Mineral + 0,5% (v/v) de petróleo + inóculo anaerobio 1
8	T7	3	100 mL de Medio Mineral + 0,5% (v/v) de petróleo + inóculo anaerobio 2
9	T8	3	100 mL de Medio Mineral + 0,5% (v/v) de petróleo + inóculo anaerobio 3
10	T9	3	100 mL de Medio Mineral + 0,5% (v/v) de petróleo + inóculo anaerobio 4
Total repeticiones		30	

2.5 Procedimientos

2.5.1 Muestreo

El muestreo se realizó en el sector de desarrollo del proyecto: “Caracterización y establecimiento de un programa de remediación de las aguas subterráneas de la parroquia San Carlos, Cantón Joya de los Sachas, Provincia de Orellana”, mediante una salida de campo para recolectar las muestras. Se tomaron 22 muestras, de las que, 14 correspondieron a las muestras sometidas a condiciones aerobias y 8 a muestras sometidas a condiciones anaerobias.

2.5.1.1 Muestras en condiciones aerobias

Para las muestras de suelo, se recolectó 1 Kg de suelo, de 10 a 15 cm. de profundidad, en fundas plásticas con cierre hermético (Ziploc® y Reynolds®) de 27 x 28 cm, por cada lugar de muestreo. De esta manera se puede obtener una población homogénea, mientras que, para las muestras de agua se utilizaron frascos con tapa rosca (Boeco®) de 250 mL de capacidad, se colectó el agua sumergiendo el frasco en su totalidad hasta que la muestra rebose la capacidad del frasco. Estos suelos y aguas se caracterizan por haber estado expuestos a contaminación y en consecuencia, se podría encontrar una mayor población de microorganismos degradadores de hidrocarburos debido al factor de aclimatación. Inmediatamente se almacenaron las muestras en un recipiente refrigerado aproximadamente a 4°C hasta su llegada al laboratorio, (Figura 2.1), (Rizzo *et al.*, 2008).



Figura 2. 1 Muestras aerobias de suelo recolectadas en la Parroquia San Carlos.

2.5.1.2 Muestras anaerobias

Para la elaboración de microcosmos en condiciones anaerobias, las muestras fueron recolectadas en medio fluido con tioglicolato para mantener las condiciones anaerobias requeridas para el desarrollo de estos microorganismos hasta su llegada al laboratorio. Se utilizaron frascos con tapa rosca (Boeco®) de 250 mL de capacidad, se colectó aproximadamente 100mL de cada muestra, los mismos que fueron colocados en los frascos con medio fluido de tioglicolato, hasta que estos rebosen. Se taparon los frascos y se sellaron con parafilm, se llevaron las muestras a un recipiente refrigerado aproximadamente a 4°C hasta su llegada al laboratorio (Figura 2.2) según Rizzo *et al.*, 2008.



Figura 2. 2 Muestras anaerobias en medio fluido de tioglicolato recolectadas en la parroquia San Carlos

Todas las muestras se trasladaron vía aérea al laboratorio de microbiología ambiental de la Escuela Politécnica del Ejército en un período de dos horas posteriores a su recolección.

2.5.2 Determinación de pH.

Para la determinación del pH se utilizó el método potenciométrico, utilizando un potenciómetro portátil de marca Hanna, modelo Hi9026. Para muestras de suelo, se pesó 1 g de la muestra y se colocó en un vaso de precipitación de 25 mL, se agregó 10 mL de agua destilada, se agitó y se dejó reposar por 10 min. Mientras tanto, se ajustó el potenciómetro con las soluciones amortiguadoras de pH 7 y 4. Pasado los 10 min se midió el pH con el potenciómetro calibrado y para muestras de agua el pH se determinó directamente en la muestra sin diluir.

2.5.3 Aislamiento de consorcios

Cada muestra de suelo se homogenizó en la bolsa contenedora, manualmente y, se resuspendió 1g de suelo en 50 mL de caldo Bushnell-Haas (BH) modificado, pH 7 (Tabla 2.2), en agitación toda la noche a 200rpm.

Tabla 2. 2 Caldo Bushnell-Haas (BH) modificado (basado en Viñas 2005).

Reactivo	Cantidad (gL ⁻¹)
Fosfato monobásico de potasio(K ₂ HPO ₄)	1.00
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	0.02
Fosfato monobásico de amonio (NH ₄) ₂ HPO ₄)	1.00
Nitrato de potasio (KNO ₃)	1.00
Cloruro férrico (FeCl ₃)	0.05
Sulfato de magnesio anhidro (MgSO ₄)	0.20

El medio BHB fue previamente esterilizado en un autoclave Marca Tuttnaver modelo 3870E, a 121°C y 15 psi de presión durante 15 min en erlenmeyers de 250mL con tapa de gasa y algodón (Figura 2.3).

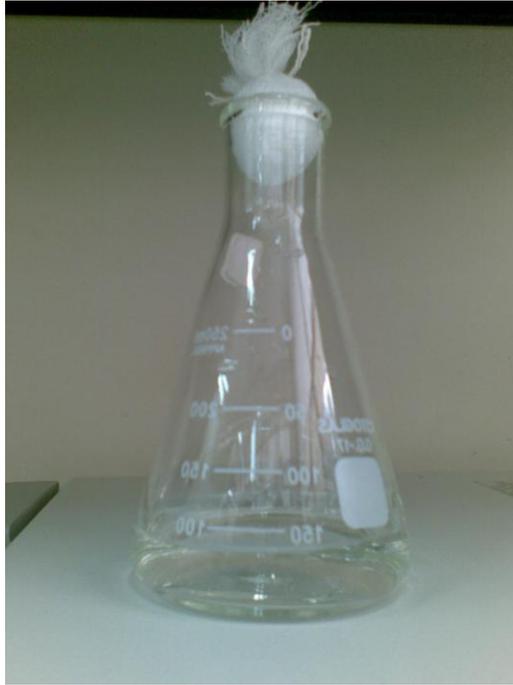


Figura 2. 3 Erlenmeyers con medio BH, utilizados para el aislamiento de los consorcios microbianos.

Pasado este tiempo se dejó reposar durante 1 h y se desecharon las partículas de suelo, según lo descrito por Viñas 2005. Se inoculó 500 μL de la resuspensión en 50 mL de medio Luria Bertani (LB), estéril, pH 7, suplementado con glucosa (Tabla 2.3) en erlenmeyers de 100 mL. Se incubó con agitación a 200rpm en un agitador orbital Marca Wiseshake y se realizó subcultivos para mantenimiento de los microcosmos cada 15 días, transfiriendo 500 μL del cultivo envejecido en 50 mL de medio LB estéril.

Tabla 2. 3 Caldo Luria Bertani (LB) modificado (basado en Viñas 2005).

Reactivo	Cantidad (gL^{-1})
Bactopentona	10
Extracto de levadura	5
Cloruro de sodio (NaCl)	2,5
Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	2

2.5.4 Determinación de microorganismos heterótrofos y degradadores de hidrocarburos.

Se cuantificó la población aerobia heterótrofa mesófila degradadora de hidrocarburos y anaerobias mediante la técnica del número más probable (NMP) (Anexo 1), descrita por Fernández. (2006), donde se pudo determinar la población heterótrofa total de las muestras y población hidrocarbonoclástica.

2.5.4.1 Población bacteriana heterótrofa bajo condiciones aerobias.

Se procedió con la técnica del número más probable, donde se tomó la resuspensión de las muestras, obtenidas en campo, en medio BH, se realizaron diluciones en serie, transfiriendo 1 mL a un tubo con 9 mL de cloruro de sodio al 0.85%, luego se agitó por 5 min en un Vortex mixer modelo vm300. Cada transferencia correspondió a una dilución de 1 en 10. Se repitió en serie el procedimiento de dilución hasta alcanzar la dilución 10. Utilizando un marcador, se dividió la caja petri en cinco zonas de igual tamaño. Se utilizó una caja por cada muestra, y se rotuló cada zona con el factor de dilución inoculado como se muestra en la Figura 2.4. Se utilizó agar LB, en las cajas petri, con un pH final de 7,2. Posteriormente se transfirió 5 µL de cada dilución en cinco puntos del área correspondiente, se sellaron las cajas con parafilm y se incubaron las placas invertidas por 7 días a 30°C en una incubadora Memmert, modelo INC 246 (Viñas, 2005).

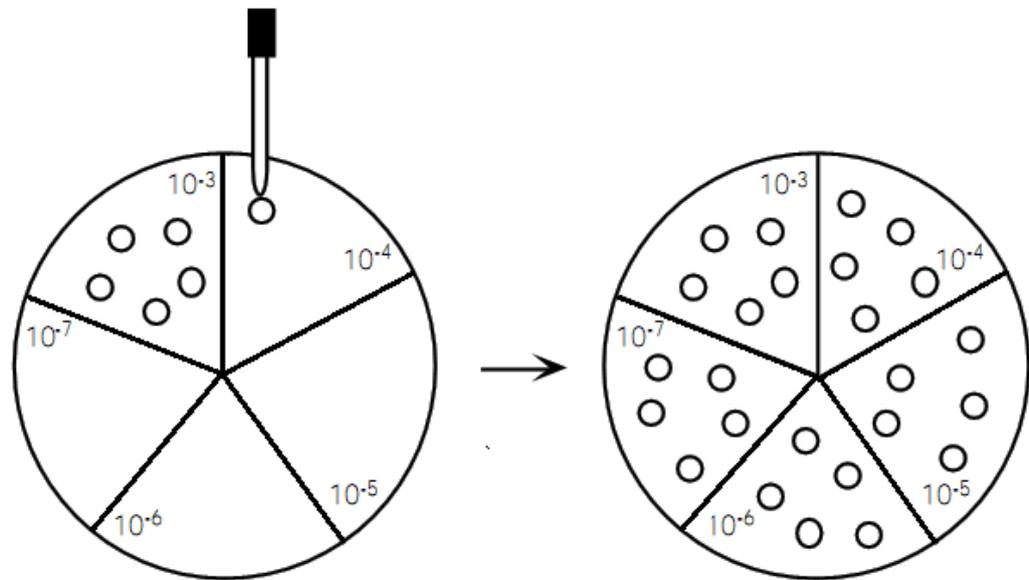


Figura 2. 4 Diluciones y siembra de muestras para conteo de microorganismos (Fernández., 2006).

2.5.4.2 Determinación de población bacteriana hidrocarbonoclástica bajo condiciones aerobias.

La población hidrocarbonoclástica se determinó por el método del número más probable (NMP). Se preparó el medio de cultivo con los componentes de la tabla 2.2 más 15 g de agar puro (agar bacteriológico), se ajustó el pH a 7 y se esterilizó en un autoclave Tuttnauer Modelo 3870E, por 15 min y 15 psi de presión. Se vació el medio en cajas petri en condiciones estériles y se esperó a que gelifique.

Se impregnó un disco de papel filtro estéril en petróleo crudo, bajo condiciones axénicas y se lo colocó en la parte interna de la tapa de la caja petri, se inoculó 5 μ L de cada dilución de forma similar a lo descrito en la

sección 2.5.4. Todos los procesos se realizaron por triplicado, a pH neutro (Fernández, 2006)

2.5.4.3 Determinación de hongos totales

Se preparó el medio de cultivo para hongos totales utilizando papa dextrosa agar (PDA), 39 g L⁻¹, llevando a ebullición hasta la disolución completa del medio. Se esterilizó el medio de cultivo en un autoclave Tuttnauer modelo 3870E, a 121°C y 15 psi de presión por 15 min. Se ajustó el pH del medio estéril a 4.9 con ácido láctico estéril al 10% y se adicionó estreptomicina, 48 mg L⁻¹ (Oxoid, 1995).

Se vació el medio en cajas petri y se esperó hasta que gelifique, se tomó 1 mL de la suspensión de la muestra en medio BH y se procedió con las diluciones, se tomó 0.1 mL de la dilución correspondiente y se colocó en el centro de la caja petri, para ser extendido con una barrilla de vidrio previamente esterilizada con alcohol. Se incubó las placas invertidas en ausencia de luz por 7 días a 30°C en una incubadora Memmert, modelo INC 246. Las inoculaciones se realizaron por triplicado similar a lo realizado por Fernández (2006).

2.5.4.4 Determinación de hongos degradadores de hidrocarburos.

Se determinó la población fúngica hidrocarbonoclásta mediante la técnica del número más probable según lo descrito por Fernández *et al.*, (2006).

El medio de cultivo utilizado para esta técnica fue el medio BH descrito en la Tabla 2.1, adicionado 15 g de agar puro (agar bacteriológico), se esterilizó en un autoclave Tuttnauer modelo 3870E por 15 min y 15 psi de presión. Una vez estéril el medio se ajustó el pH a 4.9 y se adicionó estreptomicina, 48 mg

L⁻¹ similar a lo sugerido por Oxoid (1995). Se distribuyó el medio en cajas petri hasta que gelifique, se procedió con las diluciones y se tomó 0.1 mL de la dilución correspondiente que fue colocada en la caja petri y sembrada por el método de extensión descrito por Madigan (2004) con la ayuda de una barrilla de vidrio previamente esterilizada con alcohol.

Se utilizó un disco de papel filtro estéril impregnado en petróleo y, se colocó en la tapa de la caja petri. Se sellaron las cajas con parafilm y se incubó las placas invertidas en ausencia de luz por 7 días a 30°C en una incubadora Memmert, modelo INC 246, según lo descrito por Fernández (2006).

2.5.4.5 Determinación de población total bajo condiciones anaerobias.

El método aplicado consistió en la estimación del número de microorganismos viables a partir de diluciones sucesivas, partiendo de 1 mL de sedimento en base de medio de tioglicolato, posteriormente, de tres diluciones se inocularon los tubos con medio de cultivo con sustratos y aceptores de electrones específicos. El crecimiento de los microorganismos anaerobios se evaluó por turbidez o cambio de color del medio (Fernández, 2006).

2.5.4.5.1 Medio de crecimiento

Se prepararon tubos para condiciones anaerobias tipo Hungate (tubo con tapón rosca y septo de hule) con 9 mL de medio base, el que contiene los reactivos de la Tabla 2.4, (la solución de oligoelementos se describe en la tabla 2.5) donde una vez disueltos se obtuvo una solución de tonalidad rosa debido al tioglicolato, indicativo de que hay oxígeno en el medio.

Tabla 2. 4 Medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos bajo condiciones anaerobias (Ravot *et al.*, 1995).

Compuesto	Cantidad
Solución de oligoelementos	10 mL
Agua destilada	1L
Indicador anaerobio (Tioglicolato)	1 mL
Cloruro de sodio (NaCl)	2.0 g
Cloruro de amonio (NH ₄ Cl)	1.0 g
Cloruro de calcio dihidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O)	1.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Triptona peptona	1.0 g
Cisteina-HCl	0.5 g
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0.3 g
Fosfato de potasio dibásico (K ₂ HPO ₄)	0.3 g
Cloruro de magnesio sexta hidratado (MgCl ₂ .6H ₂ O)	0.2 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.1 g

Se ajustó el pH a 7.0 con un potenciómetro Hanna modelo Hi9026, a temperatura ambiente, agregando aproximadamente 0.4 mL de KOH 1N. La tonalidad del medio se tornó azul (Figura 2.5).



Figura 2. 5 Medio de cultivo anaerobio con tioglicolato.
El color azul es indicativo de la presencia de oxígeno en el medio.

Se marcó el nivel de la solución con una línea en el matraz, y se adicionó 25% más de agua destilada. Se tapó el matraz con papel aluminio haciendo dos pequeños orificios para permitir la salida de vapor y se llevó a una plancha de calentamiento Thermo scientific, hasta ebullición. Se retiró el matraz de la plancha de calentamiento una vez que el nivel del agua llegó a la marca realizada. Se enfrió el medio con burbujeo de N_2 para mantener las condiciones anóxicas. El cambio de coloración del medio de azul a transparente es indicativo de las condiciones anóxicas del medio (Figura 2.6).



Figura 2. 6 Cambio de coloración del medio anaerobio debido a la reacción de tioglicolato en condiciones aerobias (A) y en condiciones anóxicas (B).

Se colocó los tubos de cultivo en gradillas y se introdujo mangueras con flujo de N_2 en cada uno de ellos, se adicionó 9 mL de medio de cultivo anóxico. Se cambió la atmósfera a N_2/CO_2 (80/20) en todos los tubos preparados. En el septo de cada tubo se insertó una aguja conectada con la manguera de la mezcla de gases y otra aguja libre para permitir el intercambio de gases durante 30 s. Finalmente, se esterilizó los tubos con cultivo en autoclave durante 20 min, a una temperatura de $121^\circ C$ a 15 lb/pulg^2 de presión. Una vez estériles y fríos los tubos con medio de cultivo, se adicionó con una jeringa estéril de 1 mL y bajo condiciones anóxicas (purga con nitrógeno) y estériles, 0.2 mL de solución estéril de carbonato ácido de sodio a cada tubo para obtener un pH final de 7.0 (Ravot *et al.*, 1995, Fernández,, 2005).

Tabla 2. 5 Solución de oligoelementos para cultivo de microorganismos bajo condiciones anaerobias (Ravot *et al.*, 1995).

Compuesto	Cantidad
Cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	2,5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	1,0 g
Cloruro de manganeso tetrahidratado ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,6 g
Cloruro de zinc ($ZnCl_2$)	0,1 g
Cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,1 g
Cloruro ferroso tetrahidratado ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,1 g
Cloruro de cobalto hexahidratado ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
Cloruro de aluminio ($AlCl_3$)	0,01 g
Acido bórico (H_3BO_3)	0,01 g
Molibdato de sodio dihidratado ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
Cloruro cúprico dihidratado ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
Agua destilada	1,0 L

Se adicionó a los tubos con medio de cultivo 0.2 mL de solución estéril de sulfato de sodio 1M, 0.2 mL de acetato de sodio 0.15 g mL^{-1} y 0.2 mL de cloruro férrico 1.8 mg mL^{-1} como sustratos y aceptores de electrones. Todo se realizó bajo condiciones estériles y anóxicas (purga con nitrógeno) según lo establecido por Ravot *et al.* (1995) y Fernández *et al.*, (2005).

Se mantuvo los tubos inoculados a una temperatura controlada de 30°C durante 22 días y se determinó los tubos positivos por la formación de un precipitado negro en el medio de cultivo. Se calculó el número de bacterias de acuerdo a la estimación del número más probable (NACE, 1999).

2.5.5 Selección de microcosmos con mayor actividad degradadora de TPHs

Se seleccionaron los 4 microcosmos bajo condiciones aerobias y 4 microcosmos bajo condiciones anaerobias, para ello se tomaron a los microcosmos que presentaron mayor número de unidades formadoras de colonias hidrocarbonoclásticas de acuerdo al conteo que se realizó a todas las muestras obtenidas (Viñas 2005).

2.5.6 Remoción de TPHs por los microcosmos seleccionados

2.5.6.1 Microcosmos bajo condiciones aerobias

El inóculo aerobio inicial de cada consorcio seleccionado se obtuvo de los microcosmos cultivados en medio LB, como se detalla en la sección 2.5.2. Cada cultivo se activó en caldo nutriente durante 24 h a 30 °C en una incubadora Memmert, modelo INC 246, (Figura 2.7), similar a lo realizado por Ruales (2007). Se procedió a ejecutar la técnica utilizada por Atlas (1975), donde se centrifugaron los microcosmos enriquecidos, por 15 min y se lavó el pellet con medio mineral BH con un pH de 7.0.



Figura 2. 7 Activación de los microcosmos seleccionados en caldo nutriente.

Los inóculos fueron resuspendidos a una densidad óptica de 0,75 unidades de absorbancia a 600_{nm} , según lo indicado en Viñas (2005) en un espectrofotómetro Génesis 10uv. Los consorcios degradadores se establecieron tomando 1 mL del microcosmos preparado y adicionado a 99 mL de medio mineral BH enriquecido con petróleo crudo al 0.5%, obteniendo un volumen final de 100mL (modificado de Viñas, 2005). Se ubicaron cultivos sin inóculo de microorganismos, por triplicado, como control y, se llevó a incubación con agitación a 200 rpm, en un baño María marca Precision[®] (Figura 2.8), 30°C y en oscuridad durante 22 días. Cada tratamiento se realizó por triplicado.



Figura 2. 8 Incubación de los microcosmos en baño María con agitación a 30°C.

2.5.6.2 Microcosmos bajo condiciones anaerobias

El inóculo anaerobio se obtuvo directamente de los consorcios mantenidos en medio fluido de tioglicolato. Se tomó 1 mL del consorcio, de la parte más profunda del medio, para obtener microorganismos anaerobios estrictos en el establecimiento del ensayo bajo condiciones anaerobias. Los consorcios se inocularon, mediante una jeringa, en viales con septo de hule y tapa horadada de metal tipo Wheaton[®], de 50 mL de capacidad (Figura 2.9), con 50 mL de medio base para el cultivo de microorganismos anaerobios, detallado en la sección 2.5.3.5.1 y modificado (exceptuando extracto de levadura, triptona peptona acetato de sodio), enriquecido con petróleo al 0.5% y con la adición de, 0.2 mL de solución estéril de sulfato de sodio 1M y 0.2 mL de cloruro férrico 1.8 mg mL^{-1} como aceptores de electrones, bajo condiciones estériles y anóxicas (Friedrich y Rabus, 2001). Finalmente se cambió la atmósfera a N_2/CO_2 (80/20) en todas las repeticiones. (Fernández, 2006).



Figura 2. 9 Viales con septo de hule y tapa horadada de metal tipo Wheaton[®]
Empleados para el cultivo y degradación de microorganismos anaerobios.

Todo el procedimiento se realizó por triplicado, para cada tratamiento, incluido un tratamiento blanco ausente de inoculó. Se llevó los tratamientos a incubación por 22 días en una cámara de anaerobiosis, sellada con vaselina, asegurando el consumo total de oxígeno mediante una vela (Figura 2.10).



Figura 2. 10 Microcosmos anaerobios en cámara de anaerobiosis.

2.5.7 Extracción y cuantificación de hidrocarburos totales del petróleo.

La extracción de los TPHs de los ensayos se realizó de acuerdo al método establecido por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (U.S. EPA, 2007). Se extrajeron los TPHs restantes, a los 22 días de incubación de los microcosmos y controles abióticos mediante tres extracciones seriadas líquido- líquido en Diclorometano (CH_2Cl_2) Viñas (2005) como se detalla a continuación.

Se colocó la totalidad del volumen de cada ensayo (100 mL microcosmos aerobios y 50 mL microcosmos anaerobios), previamente filtrado con filtros de membrana de $0.4 \mu\text{m}$, en un embudo de separación de vidrio de 500 mL de capacidad. Los TPHs de las muestras fueron extraídos con Diclorometano como solvente, 10 mL por cada extracción (Figura 2.11).



Figura 2. 11 Extracción de TPHs con Diclorometano en embudo de vidrio. En la figura se puede observar la emulsión obtenida por la mezcla entre la muestra y el solvente.

Se agitó vigorosamente la mezcla de la muestra con Diclorometano, por 5 min y se dejó decantar por 20 min, posteriormente se extrajo la fase más densa de la mezcla que se encontraba en el embudo y se repitió el procedimiento con la fase menos densa por tres veces. La fase densa se pasó por una columna de sulfato de sodio anhidro, con el fin de clarificar la muestra y librar de restos de agua e impurezas. A continuación se llevó la fase obtenida a evaporación y concentración mediante reflujos en un equipo Soxhlet de vidrio, que consta de un concentrador y un reflujo. El concentrador se sumergió en un baño María a 45°C (Figura 2.12).



Figura 2. 12 Equipo Soxhlet para extracción de TPHs.

El equipo de concentración se encuentra en la parte inferior izquierda de la figura y se muestra el concentrador sumergido en el baño María.

Se dejó en reflujo por 15 min, y se tomó 2 mL del concentrado, de la parte más profunda del concentrador, con una jeringa, éste concentrado se filtró en filtros para solventes orgánicos (PVFD) y se almacenó en viales color ámbar con tapón de teflón en refrigeración (Figura 2.13), hasta la cuantificación de TPHs por cromatografía de gases (Fernández, 2006 y U.S. EPA, 2007).



Figura 2. 13 Materiales utilizados para el almacenamiento de los TPHs extraídos y concentrados de los microcosmos.

Se puede observar los viales con tapa de teflón, filtros y jeringa usados en la sección 2.5.7

2.5.8 Cuantificación de Hidrocarburos Totales del Petróleo por cromatografía de gases.

Las muestras fueron analizadas mediante cromatografía de gases en un Cromatógrafo de gases *Pekin-Elmer Auto System*. Los componentes fueron separados en una columna capilar de 0.25mm de espesor, con helio como gas portador a un flujo de presión constante de 30 psi. La temperatura de la fuente fue de 250°C y, la temperatura inicial fue de 45°C. Se utilizó 1 μ L de muestra por cada análisis, inyectandola con una jeringa al cromatógrafo, la muestra fue corrida durante 60 min (U.S. EPA, 2007).

2.6 Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el software estadístico SPSS versión 15.0, para el diseño experimental planteado, utilizando el sistema operativo Windows 7[®].

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Muestreo

Como puede observarse en la tabla 3.1 se obtuvieron 22 muestras de pozos, agua y suelo de la parroquia San Carlos, Cantón Joya de los Sachas, Provincia de Orellana, 14 de las muestras correspondieron a consorcios estudiados bajo condiciones aerobias y 8 muestras a microcosmos bajo condiciones anaerobias. Se midió el pH de las muestras obteniendo valores entre 6.02 y 7.23.

Tabla 3. 1 Muestras de suelo y agua de la parroquia San Carlos, con sus respectivos valores de pH.

Código	Tipo de Muestra	Pozo	pH
Muestras aerobias			
A1	Agua	Estero Norte comunidad San Carlos	6.15
A2		Estero Sur comunidad San Carlos	6.02
A3		Estero Medio comunidad San Carlos	6.26
A4	Suelo	P10D	7.10
A5		P11	6.97
A6		P3	6.55
A7		P18D	7.14
A8		P7	7.23
A9		P1	7.16
A10		P9	6.59
A11		P5	6.98
A12		P4	7.16
A13		P12D	6.59
A14		P2	6.72
Muestras anaerobias			
N1	Suelo	Raíz plantas de estero	6.35
N2	Agua	P12D	7.01
N3		P18D	7.14
N4		Estero Norte	6.25
N5		Estero Sur	6.32
N6		Agua estancada cercana al estero	6.23
N7		Salida de agua de llenado piscina peces	6.47
N8		Estanque cercano a estero	6.28

3.2 Aislamiento y subcultivo de consorcios

Se obtuvo 22 consorcios aislados, 14 aerobios y 8 anaerobios, procedentes de las muestras colectadas en campo. Los consorcios aislados fueron denominados de acuerdo al código establecido en la tabla 3.1. El crecimiento de los microorganismos fue evidenciado por la turbiedad del medio, mostrándose de color amarillo-marrón a los 15 días de cultivo (Figura 3.1).

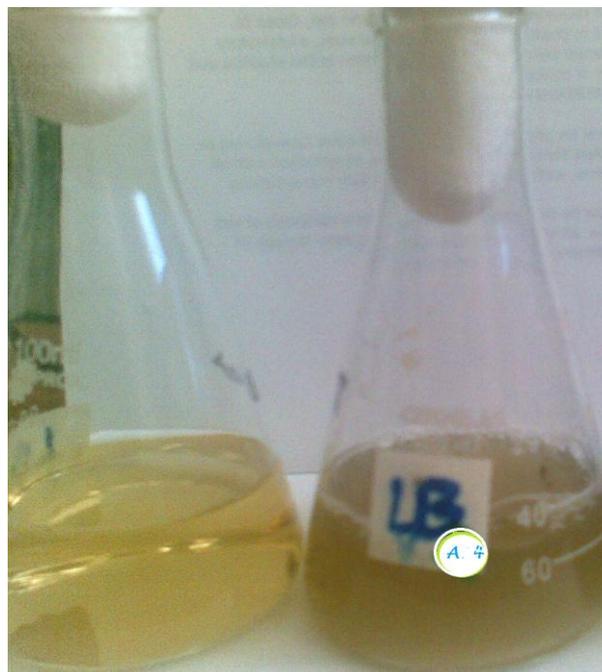


Figura 3. 1 Microcosmos aislado en medio de crecimiento LB. El matraz de la izquierda contiene el medio LB estéril antes de la inoculación del microcosmos, mientras que el matraz de la derecha contiene el medio inoculado con el microcosmos A4 después de 7 días.

Después de 15 días de cultivo el microcosmos A4 presentó la formación de espuma en su superficie, cambiando la coloración del medio de amarillo-marrón a verde como se observa en la Figura 3.2.

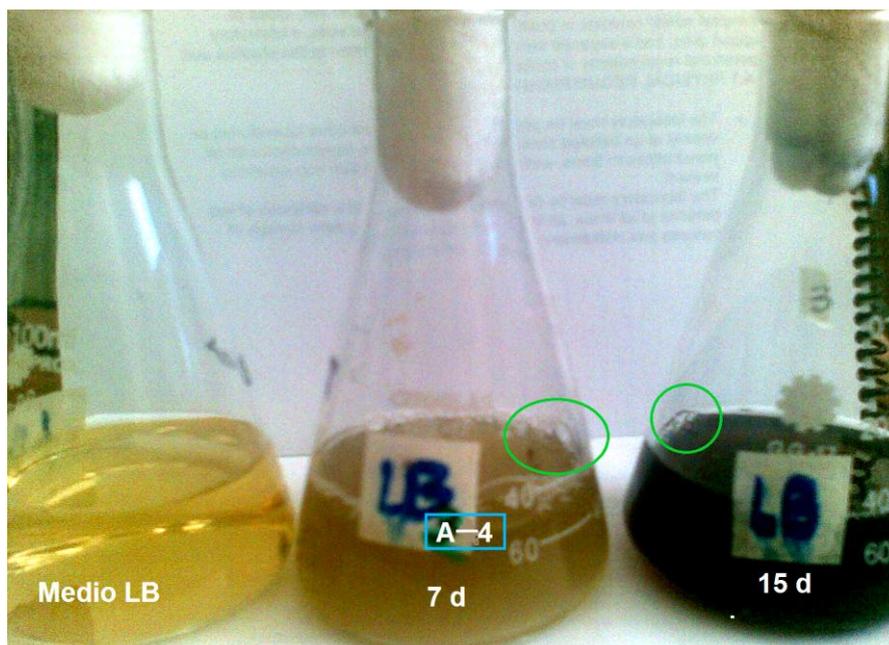


Figura 3. 2 Cultivo de microcosmos A4 en medio LB.

Se compara el microcosmos a los 7 días, color amarillento, y 15 días, color verde, con el medio LB sin inocular, la formación de espuma se marca en los círculos verdes.

3.3 Determinación de microorganismos heterótrofos y degradadores de hidrocarburos.

3.3.1 Población heterótrofa bajo condiciones aerobias

La población heterótrofa bacteriana y fúngica de los 14 consorcios aerobios, se muestra en la Tabla 3.2. Los valores obtenidos de unidades formadoras de colonias bacterianas varían entre $7.5 \cdot 10^9$ y $1.7 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹, siendo el microcosmos A12 el que presentó mayor número de UFC (Figura 3.3). En cuanto a las UFC de hongos, no todos los microcosmos presentaron población fúngica, siendo exclusivamente los microcosmos A1, A2, A8, A11, A12 y A13 los que registraron población fúngica después del tiempo de cultivo (Figura 3.3).

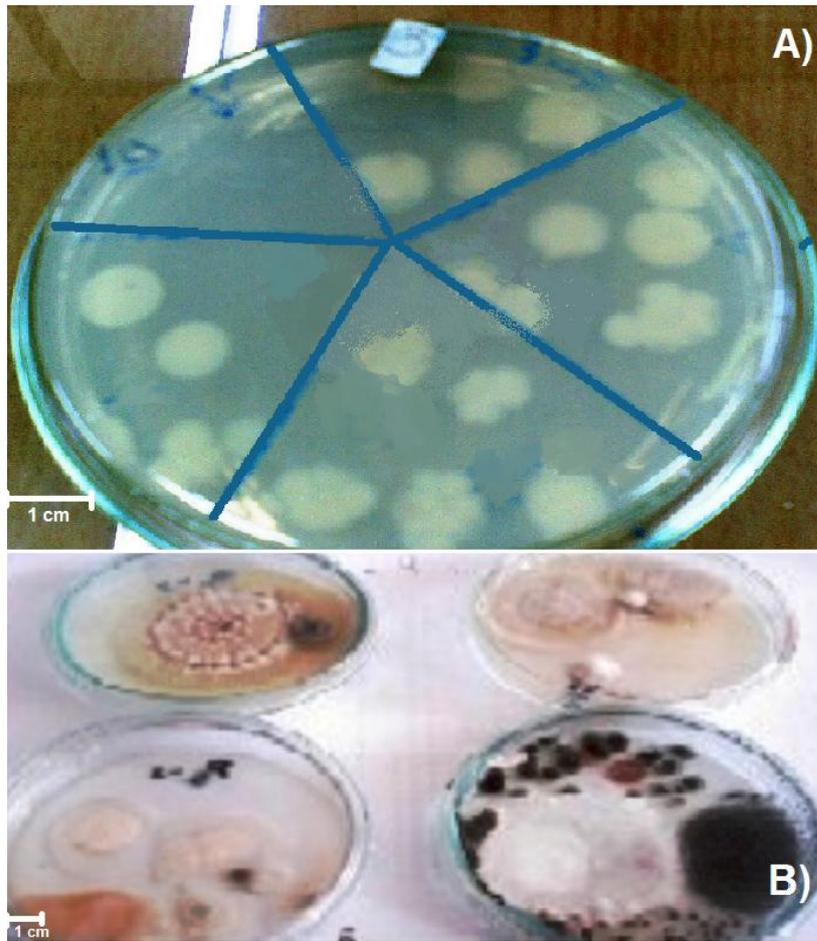


Figura 3. 3 Microorganismos heterótrofos bajo condiciones aerobias.
A) Población bacteriana heterótrofa. B) Población fúngica heterótrofa de los diferentes microcosmos.

3.3.2 Población hidrocarbonoclástica bajo condiciones aerobias

Tal como se muestra en la Tabla 3.2 se obtuvieron consorcios microbianos con una población bacteriana bajo condiciones aerobias degradadora de hidrocarburos entre el 88% y 6% de la población heterótrofa total.

Tabla 3. 2 Población de microorganismos heterótrofos y degradadores de hidrocarburos bajo condiciones aerobias.

Código	UFC heterótrofa	UFC hidrocarboclastica	% Población bacteriana degradadora	Hongos UFC	Hongos UFC hidrocarboclastica	% Población fúngica degradadora
Microcosmos aerobios						
A1	2.4 *10 ⁶	1.1 *10 ⁶	46	4 *10 ²	3 *10 ²	8
A2	2.6* 10 ⁸	1.86*10 ⁸	72	6*10 ²	1*10 ²	17
A3	2.4 *10 ⁶	1.1 *10 ⁶	46	-	-	-
A4	2.4 *10 ⁶	2.1 10 ⁶	88	1 *10 ⁵	1*10 ⁵	100
A5	2.4 *10 ⁶	2.1*10 ⁵	9	-	-	-
A6	2.4 *10 ⁶	1.5 *10 ⁵	6	-	-	-
A7	2.4 *10 ⁶	1.1 *10 ⁶	46	4 *10 ²	3 *10 ²	75
A8	1.7 *10 ⁶	2.1*10 ⁵	12	-	-	-
A9	4.9*10 ⁶	1.1*10 ⁶	22	-	-	-
A10	1.2*10 ⁶	1.85*10 ⁵	15	-	-	-
A11	1.3 *10 ⁹	9.25*10 ⁸	71	5*10 ²	5*10 ²	100
A12	7.5 *10 ⁹	3.38*10 ⁹	45	5*10 ²	2*10 ²	40
A13	1.9.*10 ⁸	1.4*10 ⁸	74	1*10 ²	1*10 ²	50
A14	6.2*10 ⁸	2.9*10 ⁸	47	-	-	-

La figura 3,4 muestra las UFC mL⁻¹ de la población heterótrofa e hidrocarboclastica bacteriana y fúngica de los microcosmos, los porcentajes de poblaciones de hongos degradadores, con relación a la población fúngica total, son mayores a los porcentajes de bacterias degradadoras.

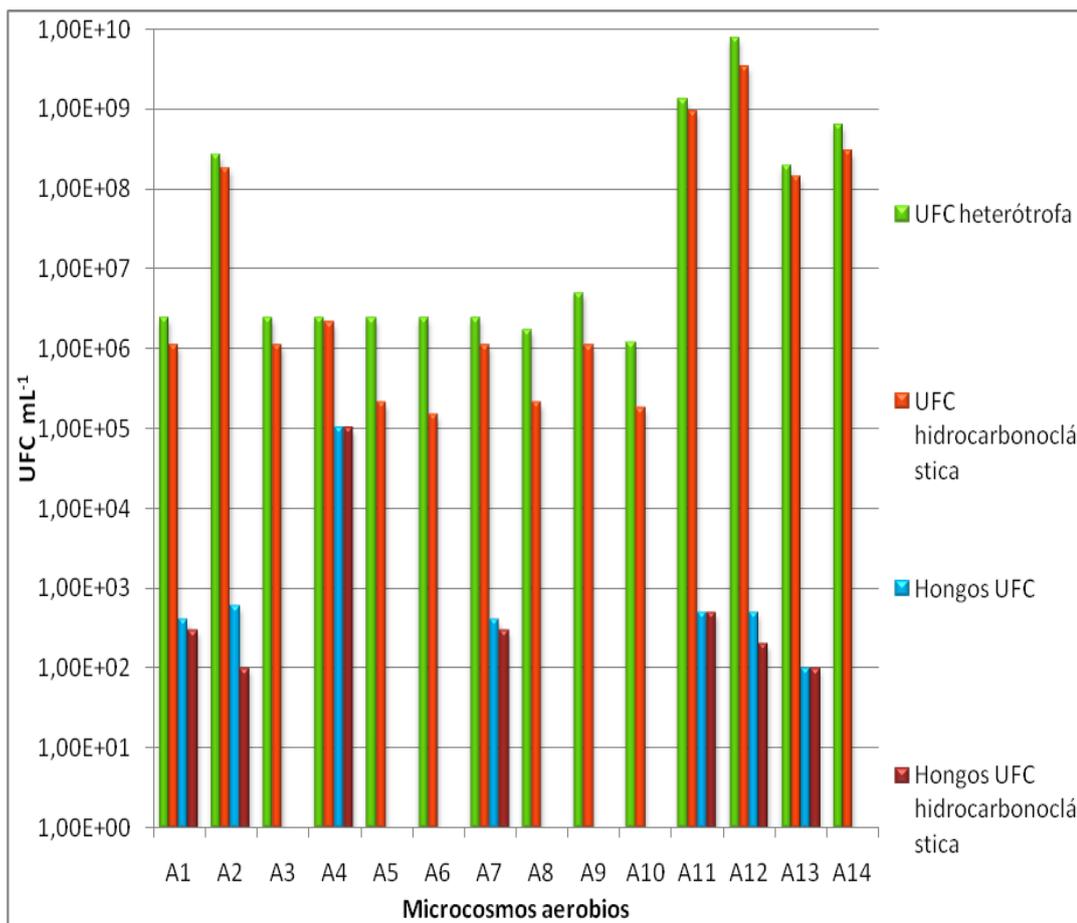


Figura 3. 4 UFC heterótrofas e hidrocarbonoclásticas bacterianas y fúngicas de los microcosmos estudiados.

Los microcosmos A2, A4, A11 y A13 fueron los que presentaron un mayor porcentaje de población degradadora de hidrocarburos con respecto a los demás microcosmos establecidos en este estudio (Figura 3.5).

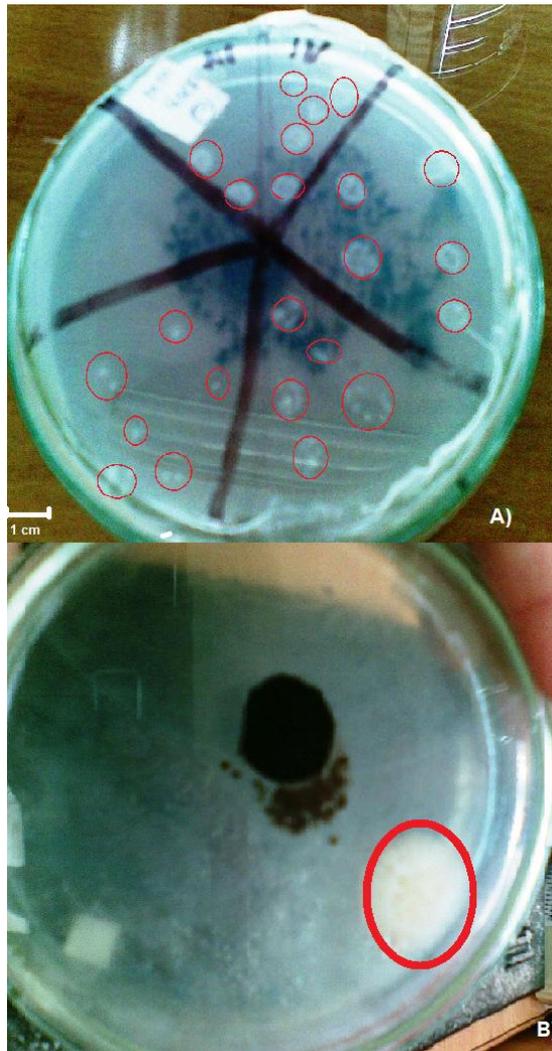


Figura 3. 5 Población hidrocarbonoclástica bajo condiciones aerobias. La figura A muestra a la población bacteriana y B a la población fúngica del microcosmos A1. Las UFC se marcan en círculos rojos.

3.3.3 Población sulfato reductora bajo condiciones anaerobias

Se determinó la población reductora de sulfatos bajo condiciones anaerobias de los ocho microcosmos establecidos (Figura 3. 6) obteniendo así, poblaciones reductoras de sulfato entre $1.3 \cdot 10^8$ y $1.2 \cdot 10^{10}$.



Figura 3. 6 Conteo de poblaciones sulfato reductoras bajo condiciones anaerobias.

El precipitado negro en la base de los tubos, círculo rojo, indica la presencia del crecimiento de bacterias bajo condiciones anaerobios.

El consorcio anaerobio obtenido del Estero Norte presentó la mayor población de UFC de las muestras recolectadas en los diferentes puntos de la zona de estudio como se muestra en la Tabla 3.3.

Tabla 3. 3 Población sulfato reductora obtenida de muestras bajo condiciones anaerobias

Código	Tipo de Muestra	Pozo	Población anaerobia sulfato reductora UFC
N1	Suelo	Raíz plantas de estero	$2.7 \cdot 10^9$
N2	Agua	P12D	$1.3 \cdot 10^9$
N3		P18D	$1.2 \cdot 10^{10}$
N4		Estero Norte	$1.2 \cdot 10^{10}$
N5		Estero Sur	$2.1 \cdot 10^8$
N6		Agua estancada cercana al estero	$1.2 \cdot 10^9$
N7		Salida de agua de llenado piscina peces	$1.3 \cdot 10^8$
N8		Estanque cercano a estero	$1.2 \cdot 10^9$

La figura 3,7 muestra las columnas de mayor tamaño, correspondientes a los microcosmos con mayor población reductora de sulfatos bajo condiciones anaerobias, siendo estos los microcosmos N3 y N4, mientras que el consorcio N7 presentó la menor población.

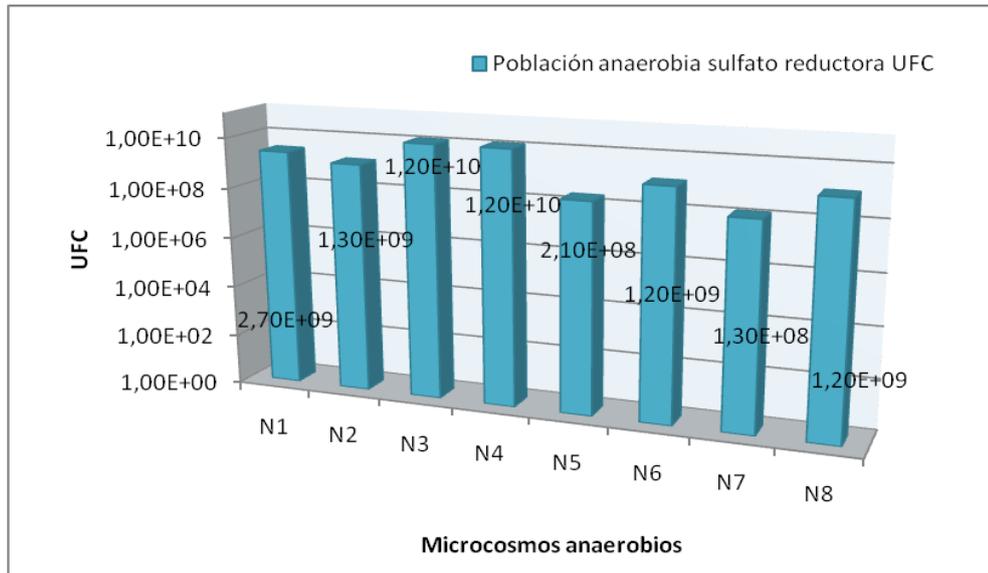


Figura 3. 7 Población sulfato reductora obtenida de muestras anaerobias.

3.4 Selección de microcosmos con mayor actividad degradadora de TPHs

Todos los tratamientos presentaron actividad degradadora reflejada en la población hidrocarbonoclástica determinada en la sección 3.3.2. La mayor población degradadora de hidrocarburos fue observada en los microcosmos A2, A4, A11 y A13 con 72%, 88%, 71% y 74% respectivamente, de la población heterótrofa total, por lo que estos microcosmos fueron seleccionados para estudiar la degradación aerobia de petróleo.

En cuanto a los microcosmos anaerobios, fueron seleccionados aquellos que presentaron la más alta población reductora de sulfatos, siendo éstos los microcosmos N1, N2, N3 y N4.

3.5 Remoción de TPHs por los microcosmos seleccionados

3.5.1 Tratamientos bajo condiciones aerobias.

Como se puede observar en los cromatogramas obtenidos de cada ensayo (Figura 3.8) después de los 22 días de tratamiento el máximo valor de TPHs biodegradados por los microcosmos aerobios se observó en el consorcio A4, con una concentración de TPHs de 10,17 ppm, el tratamiento menos efectivo fue el tratamiento A2 con una concentración de 19,45 ppm.

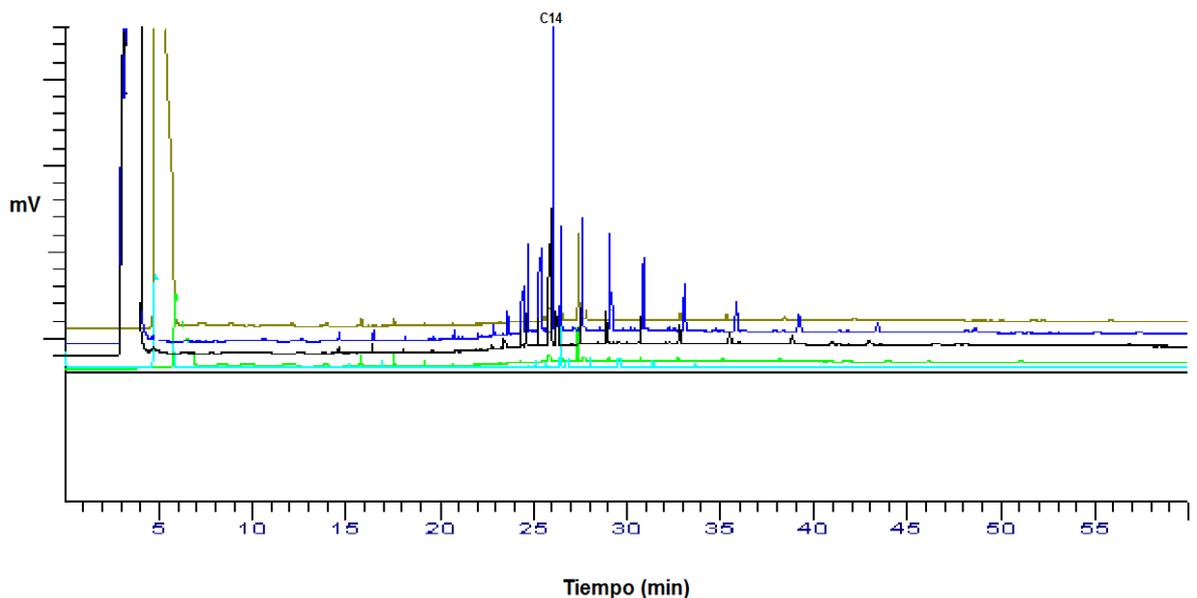


Figura 3. 8 Cromatograma de tratamientos bajo condiciones aerobias.
Azul: tratamiento control; negro: tratamiento A2; café: tratamiento A13; verde:
tratamiento A11 y celeste: tratamiento A4.

La concentración final de los tratamientos puede observarse en la figura 3.9, así como la eficiencia de biorremoción que en el caso del tratamiento A4 alcanzó el 62,31%, siendo este el valor más alto, el tratamiento menos eficiente fue A2 con una eficiencia de bioremediación del 27,91%. Todos los tratamientos tuvieron una concentración inicial de 27 ppm, incluyendo el control aerobio.

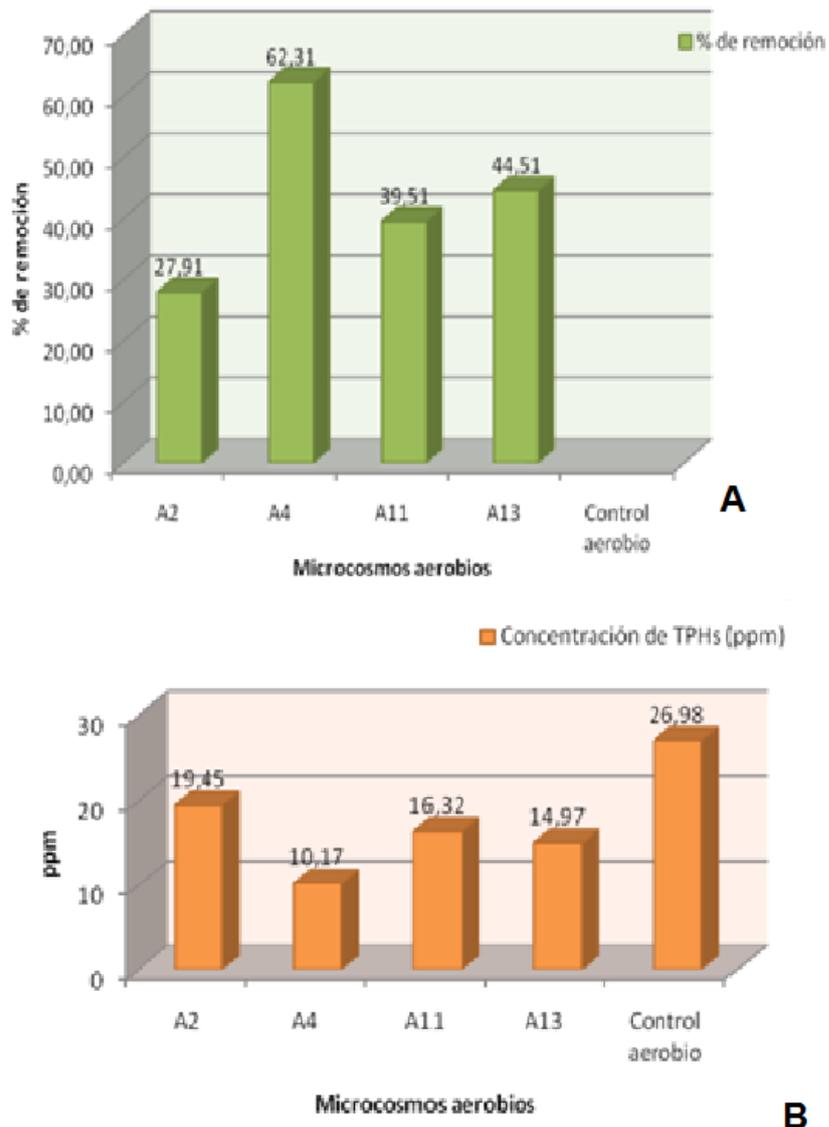


Figura 3. 9 Eficiencia de remoción de los tratamientos (A) y Concentración de TPHs (B) después de 22 días de tratamiento de los microcosmos establecidos.

De la misma manera se puede evidenciar el crecimiento de microorganismos en el ensayo, por el enturbiamiento del medio y disminución visual de la capa de hidrocarburo, siendo el tratamiento A4 el que presentó mayor disminución de la capa de crudo y formación visible de colonias fúngicas y bacterianas (Figura 3.10).



Figura 3. 10 Tratamientos aerobios después de 22 días de incubación. Se puede comparar el crecimiento de microorganismos con el tratamiento blanco. En el círculo rojo colonias fúngicas.

3.5.2 Tratamientos bajo condiciones anaerobias

Después de 22 días de tratamiento anaerobio los microcosmos presentaron una disminución en la concentración de TPHs, siendo el tratamiento N4 el que alcanzó el valor más bajo en concentración de TPHs (16,98 ppm), mientras que el tratamiento N3 presentó la concentración más alta de TPHs (24,17 ppm) en comparación con el tratamiento blanco (Figura 3.11).

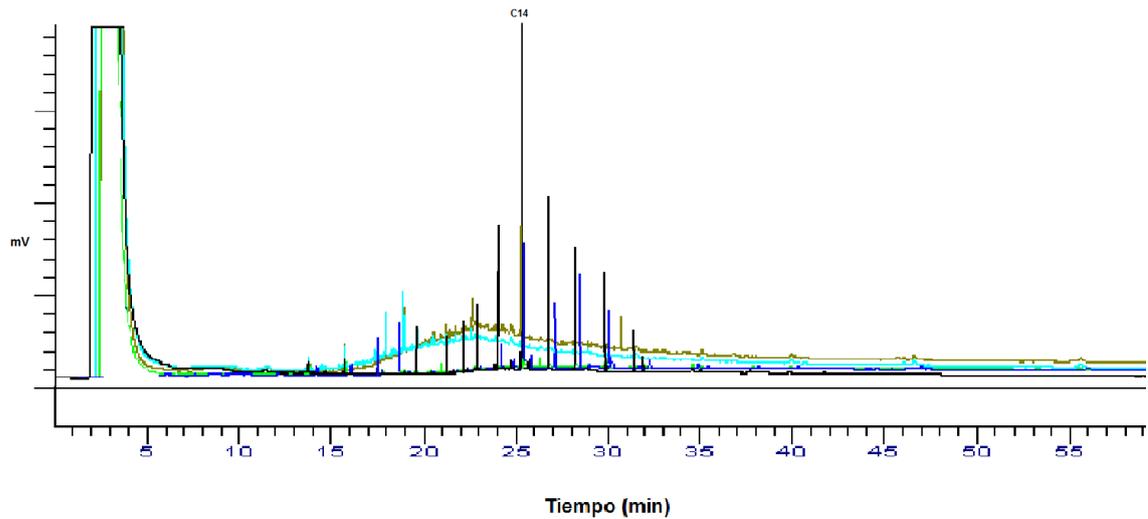


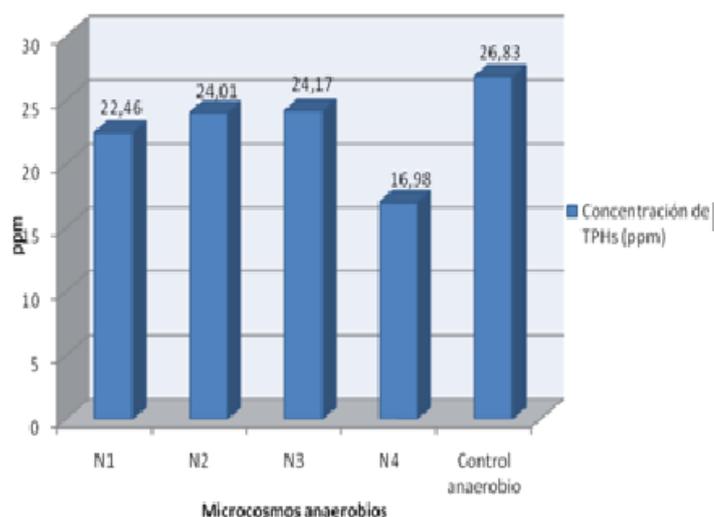
Figura 3. 11 Cromatograma de tratamientos anaerobios. Negro: tratamiento blanco; Café: N1; Celeste: N2; Azul: N3; Verde: N4.

En cuanto al enturbiamiento del medio de cultivo debido al crecimiento de microorganismos anaerobios en los tratamientos, el consorcio N4 fue el que mayor enturbiamiento presentó, de la misma manera que en los microcosmos aerobios la cantidad de crudo presente en la superficie del frasco disminuyó en el tratamiento que presento mayor enturbiamiento del medio (Figura 3.12).

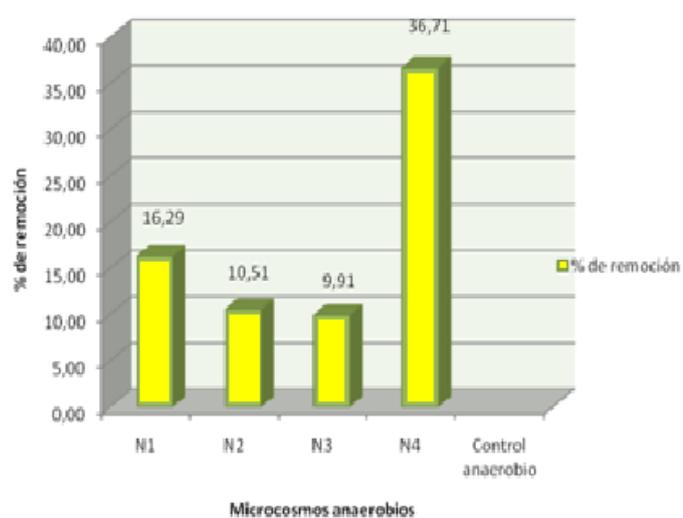


Figura 3. 12 Tratamientos anaerobios después de 22 días de incubación

La eficiencia de remoción de TPHs en el ensayo anaerobio alcanzó un máximo valor del 36.7%, observado en el tratamiento N4, mientras que el valor más bajo de eficiencia de remoción se pudo observar en el tratamiento N3 9.91% (figura 3.13)



A



B

Figura 3. 13 Eficiencia de remoción de los tratamientos (A). Concentración de TPHs (B) después de 22 días de tratamiento de los microcosmos establecidos.

El pico más alto obtenido en las cromatografías (Figuras 3.8, 3.10 y Anexos 3 y 4) representa a uno de los TPHs del grupo del rango orgánico de diesel (DROS), determinado como fenantreno, el mismo que no fue degradado en su totalidad por ninguno de los tratamientos, sin embargo el tratamiento aerobio A4 y anaerobio N4 lograron la mayor biodegradación de este compuesto según las cromatografías de gases realizadas.

3.6 Análisis estadístico del Diseño Completamente al Azar (DCA)

3.6.1 Microcosmos bajo condiciones aerobias

Realizado el análisis de varianza, ANOVA, para el diseño completamente al azar, DCA (Tabla 3.4) de la concentración final de TPHs de los tratamientos establecidos en el estudio, se puede observar que para los microcosmos aerobios existen diferencias significativas, donde al menos un tratamiento es distinto de los demás, por cuanto la significancia es menor al 0.05.

Tabla 3. 4 Análisis de varianza para la concentración final de TPHs de los tratamientos A2, A4, A11 y A13 bajo condiciones aerobias.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	214,695	3	71,565	382,309	0,000
Intragrupos	1,498	8	0,187		
Total	216,192	11			

Gl: grados de libertad

La prueba de comparación de medias Tukey (Tabla 3.5) indica cuatro niveles de significancia. El tratamiento A4 se ubica en el primer subconjunto, mientras que los tratamientos A13, A11 y A2 en los subconjuntos segundo, tercero y cuarto, respectivamente, con lo que se puede estimar que el tratamiento A4 biorremueve mayor cantidad de TPHs, a nivel de laboratorio.

Tabla 3. 5 Prueba de comparación de medias Tukey para la concentración final de TPHs de los tratamientos A2, A4, A11 y A13 bajo condiciones aerobias

Tratamiento	Subconjunto para alfa = 0.05			
	1	2	3	4
Microcosmos aerobio A4	10,1700			
Microcosmos aerobio A13		15,0067		
Microcosmos aerobio A11			16,6300	
Microcosmos aerobio A2				22,0167
Sig.	1,000	1,000	1,000	1,000

3.6.2 Microcosmos bajo condiciones anaerobias

En cuanto a la concentración final de TPHs de los microcosmos anaerobios, se realizó el análisis de varianza, ANOVA, para el diseño completamente al azar, DCA (Tabla 3.6) de los tratamientos establecidos en el estudio. La significancia es menor al 0.05, y esto demuestra que existe al menos un tratamiento distinto de los demás, al igual que en los tratamientos aerobios.

Tabla 3. 6 Análisis de varianza para la concentración final de TPHs de los tratamientos N1, N2, N3, N4 bajo condiciones anaerobias

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	214,695	3	71,565	382,309	0,000
Intragrupos	1,498	8	0,187		
Total	216,192	11			

Mediante la prueba de comparación de medias Tukey se determinaron tres subconjuntos dentro de los tratamientos anaerobios (Tabla 3.7), ubicando al tratamiento N4 y N1 en el primero y segundo subconjunto respectivamente, mientras que los tratamientos N3 y N2 se encuentran agrupados en el subconjunto 3. Se determinó que no existe mayor diferencia estadística entre estos dos tratamientos, por lo que se puede afirmar que los tratamientos N3 y N2 son los que menos TPHs lograron bioremove, mientras que el tratamiento N4 es el más adecuado en cuanto a biorremoción de TPHs a nivel de laboratorio.

Tabla 3. 7 Prueba de comparación de medias Tukey para la concentración final de TPHs de los tratamientos N1, N2, N3, N4 bajo condiciones anaerobias

Tratamiento	Subconjunto para alfa = .05		
	1	2	3
Microcosmos anaerobio N4	12,1567		
Microcosmos anaerobio N1		17,4610	
Microcosmos anaerobio N3			21,4233
Microcosmos anaerobio N2			21,9333
Sig.	1,000	1,000	,333

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento y subcultivos de consorcios

Madigan (2007), afirma que la mayoría de los ambientes naturales tienen pH con valores entre 5 y 9, encontrándose la mayor diversidad de microorganismos dentro de los rangos cercanos a la neutralidad, las muestras recolectadas en este estudio se acercan a dichos valores de pH por lo que se encontró diversidad de microorganismos. El crecimiento de los consorcios fue evidenciado por el enturbiamiento de los medios de cultivo donde se desarrollaron los microcosmos, la rapidez de este fenómeno fue determinada por el contenido de nutrientes esenciales para el crecimiento de los microorganismos, según Viñas (2005), el crecimiento eficaz de microorganismos en medio de cultivo enriquecido aumenta la capacidad de biodegradación en aplicaciones reales de biorremediación.

La producción de espuma en el consorcio A4, es traducida como la presencia de ramnolípidos y estos, según lo establecido por Viñas (2005), en su estudio de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, aumentan la capacidad de biodegradación con microcosmos, por lo que la producción natural de ramnolípidos favorece a la degradación de compuestos contaminantes y aumenta la eficiencia de degradación del tratamiento A4.

4.2 Determinación de microorganismos heterótrofos y degradadores de hidrocarburos.

La población de microorganismos degradadores de hidrocarburos puede variar de acuerdo a la exposición a la contaminación que los microorganismos han tenido en su hábitat de desarrollo (Viñas 2005). Por otra parte, Margesin et

al (2007) establece que el 1% de los microorganismos presentes en suelos poseen la capacidad de degradar hidrocarburos. Se sabe que la zona estuvo expuesta a derrames y a piscinas de crudo así como a aguas de formación contaminadas desde hace aproximadamente 40 años, lo que podría explicar la presencia de microorganismos en medios de cultivo enriquecidos con petróleo como única fuente de carbono.

El número de unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹) en los microcosmos aerobios varía entre 1.7 E 10⁶ y 7.5 E 10⁹, similar a lo mencionado por Scssitsch *et al* (2001), donde se determinó que la cantidad de microorganismos en muestras superficiales varía entre 10⁴ y 10⁹ UFC mL⁻¹, mientras que los hongos se encuentran en dos órdenes menos de UFC. La cantidad de población hidrocarbonoclástica presente en los microcosmos depende del tiempo de exposición de los microorganismos a hidrocarburos en sus ambientes naturales. Las poblaciones de bacterias y hongos heterótrofos e hidrocarbonoclásticos difieren según la zona de su procedencia y su exposición a derrames o contaminación con hidrocarburos, esto es comprobado, una vez más, con lo mencionado por Rivera *et al* (2000), donde los resultados de su estudio establecen que existen diferencias estadísticas significativas en la media de las poblaciones según el grado de contaminación y tipo de suelo. Por otro lado, Bregnard *et al* (1996), obtuvo de muestras superficiales, recolectadas por excavación, más de 10⁶ UFC por g de suelo, utilizando la técnica del NMP, resultados similares a los de este estudio.

Se determinó la población de bacterias anaerobias sulfato reductoras, ya que según Fernández (2006), en lugares donde existen residuos de perforación y de hidrocarburos hay altas concentraciones de sulfatos y condiciones de baja concentración de oxígeno. Condiciones que favorecen la presencia de bacterias sulfato reductoras en mayor número que otro tipo de bacterias anaerobias. La población de bacterias nitrato reductoras no se ve afectada por una exposición previa a la contaminación.

4.3 Selección de microcosmos con mayor actividad degradadora de TPHs

La selección de los microcosmos aerobios se realizó por la cantidad de población degradadora de petróleo que se encontraron formando la comunidad microbiana del consorcio, donde el crecimiento de estos microorganismos en un medio mínimo con hidrocarburo como única fuente de carbono y energía determinó la capacidad degradadora de los mismos (Fernández, 2006).

Los microcosmos aerobios A2, A4, A11 y A13 revelaron el mayor contenido de población hidrocarbonoclástica alrededor del 70% de la población heterótrofa total. Los estudios realizados por Viñas (2005), revelan un contenido del 58% de población hidrocarbonoclástica sobre la población total heterótrofa del estudio. Deyta *et al* (1995), afirman en su investigación, que el 3% de la población bacteriana total tiene capacidad hidrocarbonoclástica, lo que demuestra que el contenido de población degradadora varía según el lugar de muestreo y exposición. García (2010) menciona que los microorganismos cultivados bajo condiciones aerobias, con petróleo como fuente de carbono, son de tipo heterótrofas, facultativas y mesófitas de crecimiento rápido. La cantidad de población degradadora de petróleo asegura un consumo más rápido y eficiente del hidrocarburo como sustrato para los microorganismos (Margesin *et al.*, 2007).

El tiempo de crecimiento de las UFC hidrocarbonoclásticas de los microcosmos fue diverso, esto puede explicarse por la etapa de aclimatación requerida por los microorganismos para poder degradar compuestos orgánicos (Ferrera *et al.*, 2006).

Según IMP (2004), en suelos contaminados con hidrocarburos, bajo condiciones limitadas de oxígeno o anóxicas, las bacterias anaerobias estrictas son las que metabolizan el hidrocarburo, utilizándolo como sustrato y, como

aceptor de electrones utilizan compuestos oxidados como sulfatos, la población anaerobia seleccionada se realizó por el mayor NMP de bacterias sulfato reductoras, en donde al igual que los microcosmos aerobios la población bacteriana varió según el lugar de procedencia, por lo que fueron los microcosmos N1, N2, N3, y N4 los que presentaron mayor NMP de bacterias sulfato reductoras, las mismas que según Fernández (2006) tienen la capacidad de degradar hidrocarburos.

4.4 Remoción de TPHs por microcosmos seleccionados

Los microcosmos estudiados muestran una considerable eficiencia de biodegradación de petróleo utilizado como única fuente de carbono y energía. La eficiencia de biodegradación de cada uno de los consorcios es consistente con la población microbiana heterótrofa e hidrocarbonoclástica (Viñas 2005).

En cuanto a los tratamientos aerobios, el crecimiento de los microorganismos se evidenció por el enturbiamiento del medio, siendo el tratamiento A4 el que presentó mayor enturbiamiento y la presencia evidente de colonias fúngicas. Este mismo tratamiento presentó mayor remoción de TPHs lo que puede deberse a la capacidad del microcosmos para formar ramnolípidos que solubilizan los hidrocarburos y mejoran la biodegradación (Kanga *et al.*, 1997). La presencia visible de colonias fúngicas y bacterianas en el tratamiento A4 se debe a una sintrofia, donde la acción concertada de los diferentes microorganismos que conforman el microcosmos, sobre el hidrocarburo permiten la degradación del contaminante (Maroto *et al.*, 2008). Además el contenido de población hidrocarbonoclástica del tratamiento confirma lo señalado por Rittman (1994), donde la exposición prolongada de los microorganismos a hidrocarburos aumenta la capacidad de estos para biodegradar.

Para los microcosmos anaerobios fue evidente la formación de precipitado negro, sulfuro de hierro, en el fondo de los frascos Wheaton[®], siendo el tratamiento N4 el que presentó mayor sulfato reducción, similar a lo descrito por Fernández (2006) quien expone que una buena degradación de hidrocarburos en medio anaerobio es evidenciada por la presencia de precipitado de sulfuro de hierro, resultado de la reacción de sulfuro de hidrógeno producido por la reducción biológica de sulfatos y uso de hidrocarburos como sustrato de los microorganismos.

No hay duda de que la degradación de petróleo y productos refinados es mucho más rápida bajo condiciones oxigénicas que anóxicas, como puede demostrarse fácilmente en cultivos de enriquecimiento comparativo con y sin aire (Widdel y Rabus, 2001). La eficiencia de biorremoción en los tratamiento anaerobios varía entre el 36.71%, tratamiento N4 y 9.91% para el tratamiento N3. Los microorganismos aeróbicos parecen degradar una gama más amplia de hidrocarburos que los microorganismos anaerobios. Sin embargo, un argumento en apoyo del desarrollo de los procedimientos de biorremediación anaeróbica establecido por Rabus *et al* (2001) es la observación de que el benceno, tolueno, fenantreno, xilenos y etilbenceno son degradables sin oxígeno, además, son los hidrocarburos aromáticos más solubles en agua. Comparando los cromatogramas de los tratamientos anaerobios, el tratamiento N4, que posee la mejor eficiencia de remoción, ya que presenta una reducción mayor del pico C14, correspondiente al fenantreno, esto es debido a la degradación anaerobia de este compuesto, mientras que los demás tratamientos presentan un pico más elevado, como se puede observar en el ANEXO 4.

La concentración de TPHs removida por los tratamientos se ve traducida en la eficiencia de degradación de estos. Dentro de los tratamientos aerobios, como se había expuesto en el párrafo anterior, el tratamiento A4 alcanzó el mayor porcentaje de eficiencia de biorremoción de TPHs, con un porcentaje de 62.31%, mientras los tratamientos A2, A11 y A14 alcanzaron 27.91%, 39.51% y

44,51% respectivamente, superando a los valores reportados por Viñas (2005), quien alcanzó eficiencias de remoción del 16 al 37%. Sugiura *et al* (1997) describieron una degradación del 19-34% de TPHs mediante un consorcio no definido. Por otro lado, Palittapongarnpim *et al* (1998) describieron cepas bacterianas aisladas con una eficiencia de degradación de TPHs entre un 26% y 63%. Sin embargo las cromatografías realizadas en este estudio mostraron la presencia de picos mayores. Chhatre *et al* (1996) describió un consorcio definido que degradó 70% de TPHs, estos datos se obtuvieron suministrando concentraciones de fracciones de hidrocarburos al cultivo, por lo que no son totalmente comparables con la degradación de crudo completo. El tiempo de incubación de los tratamientos es un factor determinante en la degradación de crudo, Dibble y Bartha (1997) consiguieron un porcentaje de biodegradación de crudo mayor al 50% en 180 días de incubación, por lo que los resultados obtenidos en este estudio son muy favorables a pesar del corto tiempo de incubación.

Los resultados de la eficiencia de remoción de TPHs, por parte de los microcosmos empleados en este estudio, demuestran claramente una mejora en los procesos de biorremediación estudiados por otros autores, la concentración inicial de TPHs y el tiempo de incubación fue igual a lo utilizado por Viñas (2005), 0,5% v/v de concentración y 22 días de incubación, sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio varían significativamente, lo que demuestra que la utilización de los microcosmos seleccionados es viable para su aplicación futura en campo, llegando a los límites permisibles de concentración de TPHs en ecosistemas frágiles , $<1000 \text{ mgKg}^{-1}$, en un tiempo menor los establecidos por tratamientos previos.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

Todas las muestras obtenidas de la parroquia de San Carlos poseen un pH cercano a la neutralidad, siendo adecuadas para el cultivo de microcosmos degradadores de hidrocarburos en ambientes equilibrados.

Cuatro de los catorce consorcios aerobios obtenidos presentaron poblaciones degradadoras de hidrocarburos en mayor proporción, por lo que fueron seleccionados para la ejecución del estudio. Mientras que cuatro de los 8 consorcios anaerobios presentaron mayor NMP, por lo que fueron seleccionados para formar los tratamientos de degradación anaerobia.

Las poblaciones de microorganismos heterótrofos de este estudio varió entre $1,3 \cdot 10^9$ y $7,5 \cdot 10^9$ para bacterias y entre $1 \cdot 10^5$ y $5 \cdot 10^2$ para hongos, mientras que las poblaciones de microorganismos degradadores de hidrocarburos varía según el área de muestreo, obteniéndose entre el 6 y 88% de estos microorganismos según el consorcio en análisis.

La presencia de poblaciones anaerobias en las muestras determina una baja concentración de oxígeno en el lugar de muestreo, obteniendo poblaciones sulfato reductoras entre $1,3 \cdot 10^8$ y $1,2 \cdot 10^{10}$ UFC mL⁻¹.

El conteo de microorganismos en el suelo y agua de la parroquia revela el contenido de hidrocarburos en el sector, ya que la población anaerobia reductora de sulfatos se encuentra en mayor proporción que la población heterótrofa total.

Los cuatro microcosmos aerobios tuvieron la capacidad para degradar hidrocarburos con una eficiencia del 27.91 al 62.31%, la presencia de ramnolípidos incrementa la degradación de TPHs por los microcosmos, por lo el tratamiento que presentó la formación de estos compuesto obtuvo la mayor eficiencia de biorremoción del estudio.

Los microcosmos anaerobios obtuvieron una eficiencia de remoción menor a los tratamientos aerobios, del 9.91% al 36.71%, a pesar de que estos son capaces de degradar mejor al fenantreno.

La degradación de crudo de petróleo es más rápida en condiciones oxigénicas que anóxicas, sin embargo el tiempo de incubación de los tratamientos influye directamente sobre la eficacia de degradación.

El microcosmos A4 presenta mayor capacidad de biodegradación, por lo que su uso mejoraría los tratamientos de remediación de hidrocarburos, mientras que el microcosmos anaerobio N4 presenta mayor capacidad de degradación de compuestos del rango orgánico del diesel (DROS).

Los cuatro microcosmos aerobios presentan diferencias significativas, estableciéndolos en distintos subconjuntos, mientras que los cuatro microcosmos anaerobios se establecen en tres subconjuntos.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar la eficiencia de los microcosmos en tierra para determinar más certeramente la capacidad de biorremediación de los tratamientos estudiados en aplicaciones en el campo.

Evaluar la capacidad de los microcosmos para degradar crudo con la adición de ramnolípidos naturales.

Es recomendable prolongar el tiempo de biodegradación para evaluar la eficiencia de los microcosmos.

Se recomienda aumentar los receptores de electrones disponibles en el agua de los tratamientos anaerobios en concentraciones superiores a la del oxígeno disuelto del aire, para realizar una degradación anaerobia completa y más eficiente.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Abed, M., M. R., Safid, N., Köster, J. (2002). Microbial diversity of a heavy polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. Applied and environmental microbiology. 68(4) 1674-1683.

Anderson RT, Lovley DR (2000) Hexadecane decay by methanogenesis. Nature 404:722-723.

Arp, D., Yeager, C., Hyman, M. (2001). Molecular and cellular fundamentals of aerobic cometabolism of trichloroethylene. Biodegradation 12:81-103

Arroyo, E., Quesada, J. (2002). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. Geocisa. División de Protección ambiental de suelos. 298. Extraído el 18 de mayo, 2009, de: <http://www.geocisa.com>.

(A.O.P.) Asociación Española de Operadores de Productos Petrolíferos. (2002). "Origen y Formación del Petróleo" Capítulo N° 1. Extraído el 18 de mayo, 2009, de: <http://elpetroleo.aop.es/indexelpetroleo.asp>.

Atlas, R. Bartha, R. (2002). Ecología Microbiana y Biotecnología Ambiental. España. Addison Wesley.

Benavides J, Quintero G, Guevara A, Jaimes D, Gutiérrez S, Miranda J. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. sc. se.

Bozo L., Fernández M., López M.; Reyes R, Suarez P. (2007). Biomarcadores de contaminación química en comunidades microbianas. Revista de Ciencia y Tecnología de América. 32(001), 8-13.

Branco, S.M., 1984. Limnología sanitaria, estudio de la polución de aguas continentales. Monografía científica Nro. 28, serie Biología, OEA, 119.

Bracho. M., Díaz. L., Soto. L. (2005). Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado Zulia, Venezuela LUZ 10.

Bregnard, T. (1996). Aerobic and denitrifying biodegradation of weathered diesel fuel in aquifer material, Ph-D Thesis ETH. Zúrich, Nr. 98.

Briseño, B., Jonte, L., Ortega, J., Rosales, N. Y Morales, E. (2003). Respuesta de las Cianobacterias Tropicales *Synechocystis minuscula* y *Limnolhrix* sp. a derivados del petróleo. Acta Biológica Venezuela. 23 (4), 31-41.

Bury, J., Miller, C. (1993). Effect of micellar solubilization of biodegradation rate of hydrocarbons. Environ.Sci.Technol.27:104-110.

Chhatre, S., H. Purohit, R. Shanker y P. Khanna. (1996) Bacterial consortia for crude oil spill remediation. Water Sci. Technol 34:187-193.

Dibble, J. T., and R. Bartha. (1997) The effect of environmental parameters on the biodegradation of oily sludge. Appl. Environ. Microbiol. 37 :729-739.

Fernández, L. (2006) Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remoción de sitios contaminados con hidrocarburos: 179. México: se.

Ferrera, C., Rojas, N. (2006) Procesos de biorremediación del suelo y agua contaminados con hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. Revista latinoamericana de microbiología 48 (2): 179-178. Extraído el 12 de noviembre, 2009, de <http://www.sibuc.puc.elsibucindex.html>.

Friedrich Widdel., Ralf Rabus. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. Institut für Marine Mikrobiologie, Celsiusstrasse. Bremen, Alemania.

Goutx, M., Berland, B., Leveau, M., Bertrand, J. (1986). Effects of petroleum biodegradation Products on Phytoplankton Growth. Growthgerbam. Extraído el 12 de noviembre, 2009, de <http://www.ifremer.fr/Docelec/Doc/1984/acte-1017Pdf>.

Greene, E., Jaber, K. (2002). Composition of soil Microbial Communities Enriched on mixture of aromatic Hydrocarbons. Applied Environmental

Microbiology, 66 (12): 5282-5289. Extraído el 17 de enero, 2010 de <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=92457&blobtype=pdf>

Grishchenkov, V. G.; R. T. Townsend, T. J. Mc Donald, R. L. Autenrieth, J. S. Bonner y A. M. Boronin. 2000. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. Process Biochemistry (Oxford) 35:889-896.

H. Consejo Provincial de Orellana, (2009). Extraída 14 de Diciembre, 2009, de, http://www.hcpo.gov.ec/index.php?option=com_content&task=view&id=333&Itemid=33.

IMP, 2004. Atenuación natural de suelos contaminados con hidrocarburos. ISBN 968-489-031-1.

Kanga, S., Bonner, C. y Mills M. (1997). Solubilization of naphthalene and methyl substituted naphthalenes from crude oil using biosurfactants. Environ Sci. Technol. 31:556-561.

Leahy, J., Colwell, R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews, 54,3,305-315. Extraído el 8 de diciembre, 2009, de <http://mmbbr.asm.org/cgi/reprint/54/3/305>

Lopolito, M., Miolina, T. (1996). Biodegradación de hidrocarburos y compuestos relacionados. Consideración para el desarrollo. México: AiDISD.

Lovley DR, Baedeker MJ, Lonergan DJ, Cozzarelli IM, Phillips EJP, Siegel OI (1989). Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. Nature. 339:297-300.

Manab, S., Bhattacharya, D. (2004). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by newly discovered enteric bacterium. Environmental Microbiology. 70 (5): 3163-3166.

Madigan, M., Martinko, J., y Parker, J. (2007). Biología de los microorganismos. México. Prentice-Hall Hispanoamericana S.A.

Margesin, R. Hammerle, M. (2007). "Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil". Microbial Ecology. 53. 259-269.

Mendoza. M, 2008, Efectos Mortales Explotación Petrolera, Extraído el 8 de diciembre, 2009, de:

http://asambleaconstituyente.gov.ec/blogs/manueldejesus_mendoza/2008/07/19/efectos-mortales-explotacion-petrolera-3

Moreno, C., Becerra, G. (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. Revista Iberoamericana de Micología. 21: 103-120.

Muñoz, R., Guieysse, B. (2006). Algal- bacterial processes for treatment of hazardous contaminants Water Research. 40 (15): 2799-2815.

NACE International. (1990). Review of current practices for monitoring bacterial growth in oilfield systems. Item 54281. Huston.

Oilwatch.org, (2005). La explotación Petrolera en el Ecuador. Extraído el 8 de diciembre, 2009, de:

http://www.oilwatch.org/doc/documentos/fases_e_impactos_actividad_petrolera_ecuador-esp.ppt

Palittapongarnpim, M., Pokethitiyook E., Upathan S. y Tangbanluekal L. (1998). Biodegradation of crude oil by soil microorganisms in the tropic. Biodegradation 9:83-90.

Rabus R, Nordhaus R, Ludwig W, Widdel F: Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. Appl Environmental Microbiol 2001, 59:1444-1451.

Ravot, G., Magot, G., Patel, C. Thiosulphate reduction, an important physiological feature shared by members of the order Thermotogetes. Appl Environmental Microbiol 1995.61:2053-2055

Rivera M., Ferrera R., Volke V., Rodriguez R., y Linares L. (2000). Adaptacion y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivo enriquecidos con petróleo crudo. Terra. 20:423-434.

Rojas, O., Moreno, M., (2005). Biodegradación de gas oil rango Diesel por un cultivo mixto de bacterias. Revista ciencia. 13 (1): 23-33.

Ruales, M. (2007) Realización del seguimiento mediante análisis de laboratorio del tratamiento de biorremediación de los residuos provenientes de los tanques de almacenamiento de crudo. Quito: Qmax Ecuador.

Safonova, E., Dmitrieva, L. (1999) alcatrofic bacteria in black oil decomposition. Resources, Conservation and Recycling. 27: 193-201.

Sessitsch, A., Weilharter, M. Gerzabek A., Kirchmann M. y E. Kandeler. (2001). Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. Appl. Env. Microbiol. 67:4215-4224.

Steffan, R., McClay, K., Vainber, C, y Zhang, D. (1997). Biodegradation of gasolina by propane-oxidizing bacteria. Applied and environmetal Microbiology. 63: 4216:4222.

Sugiura M., Ishihara T., Shimauchi S. y Harayama S. (1997). Physicochemical Properties and Biodegradability of Crude Oil. Environ. Sci. Technol.31:45-51.

US. Environmental Protection Agency. 1996. Test methods for evaluating solid wastes." online at <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/3611b.pdf>

Valderrama, B. (2004). Microbiología del petróleo y sus derivados. Microbials on line. Extraída el 12 de noviembre, 2009, de <http://Biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios>.

Van Hamme J, Singh A, Ward O, 2003, Recent Advances in Petroleum Microbiology, Department of Biological Sciences, University College of the Cariboo.

Vargas, G., Dussan, J. (2004). Biorremediación de residuos del petróleo. Revista Hipótesis. Apuntes científicos Uniandinos on line. Extraída el 13 de noviembre 2009, de <http://ciencia.uniandes.edu.co>.

Varea A, 1995, Marea Negra en la Amazonía, Impacto Socio Ambiental de la Actividad Petrolera, estudio de caso de las comunidades de San Carlos y La Primavera: 265-294. Ecuador.

Viñas, M. (2005). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: Caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica: 301. Barcelona.

Vroblesky y Champel F. (1994), Temporal changes of terminal electron, accepting processes in a petroleum hydrocarbons contaminated accuifers and the significance for contaminant biodegradation. Water reserches. 30:1561-1560.

Volke, S., Velasco, T. (2003). Biodegradacion de suelos contaminados con petróleo mediante composteo. Centro nacional de investigación y capacitación ambiental.3-4. Extraído el 8 de diciembre, 2009, de <http://www.ine.gov.mx/ciencia/download/composteo2003.pdf>

Widdel F., Rabus R, Nordhaus R, Ludwig W. (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. Appl Environmental Microbiol, 12:259–276.

Woomer,L., Martin, A., Albrecht, D. (1994). The importance and management of soil organic matter in tropics. The Biological Management of Tropical Soil Fertility. Chichester. US.

ANEXOS

ANEXO 1: Tabla del número más probable para series de diluciones en réplicas de cinco por nivel de dilución (Woomer, 1994).

Núm. Respuestas Pos. por Nivel de Dilución	Población estimada	Núm. Respuestas Pos. por Nivel de Dilución	Población estimada
1-2-3-4-5-6		1-2-3-4-5-6	
1-0-0-0-0-0	1.9	5-5-4-2-0-0	2159
1-1-0-0-0-0	4.0	5-5-4-3-0-0	2716
2-0-0-0-0-0	4.4	5-5-5-0-0-0	2305
2-1-0-0-0-0	6.8	5-5-5-0-1-0	3126
3-0-0-0-0-0	7.7	5-5-5-1-0-0	3282
3-1-0-0-0-0	10	5-5-5-1-1-0	4532
3-2-0-0-0-0	13	5-5-5-2-0-0	4922
4-0-0-0-0-0	12	5-5-5-2-1-0	6918
4-1-0-0-0-0	16	5-5-5-3-0-0	7797
4-2-0-0-0-0	21	5-5-5-3-1-0	10702
4-3-0-0-0-0	27	5-5-5-3-2-0	13826
5-0-0-0-0-0	23	5-5-5-4-0-0	12753
5-0-1-0-0-0	31	5-5-5-4-1-0	16902
5-1-0-0-0-0	33	5-5-5-4-2-0	21589
5-1-1-0-0-0	45	5-5-5-4-3-0	27150
5-2-0-0-0-0	49	5-5-5-5-0-0	23054
5-2-1-0-0-0	69	5-5-5-5-0-1	31225
5-3-0-0-0-0	78	5-5-5-5-1-0	32720
5-3-1-0-0-0	107	5-5-5-5-1-1	45261
5-3-2-0-0-0	138	5-5-5-5-2-0	49224
5-4-0-0-0-0	127	5-5-5-5-2-1	69148
5-4-1-0-0-0	169	5-5-5-5-3-0	78127
5-4-2-0-0-0	216	5-5-5-5-3-1	107022
5-4-3-0-0-0	270	5-5-5-5-3-2	138269
5-5-0-0-0-0	230	5-5-5-5-4-0	127528
5-5-0-1-0-0	312	5-5-5-5-4-1	169028
5-5-1-0-0-0	327	5-5-5-5-4-2	215899
5-5-1-1-0-0	453	5-5-5-5-4-3	271557
5-5-2-0-0-0	488	5-5-5-5-4-4	334051
5-5-2-1-0-0	692	5-5-5-5-5-0	230546
5-5-3-0-0-0	780	5-5-5-5-5-1	328192
5-5-3-1-0-0	1070	5-5-5-5-5-2	492238
5-5-3-2-0-0	1383	5-5-5-5-5-3	781272
5-5-4-0-0-0	1275	5-5-5-5-5-4	1312535
5-5-4-1-0-0	1690		

Esta es la densidad poblacional estimada asumiendo 1 mL de inóculo.

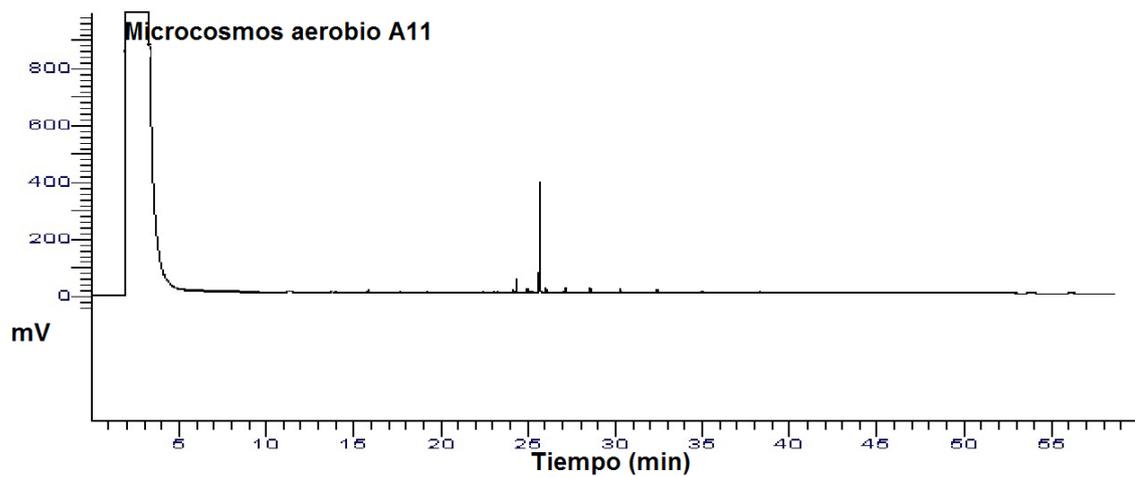
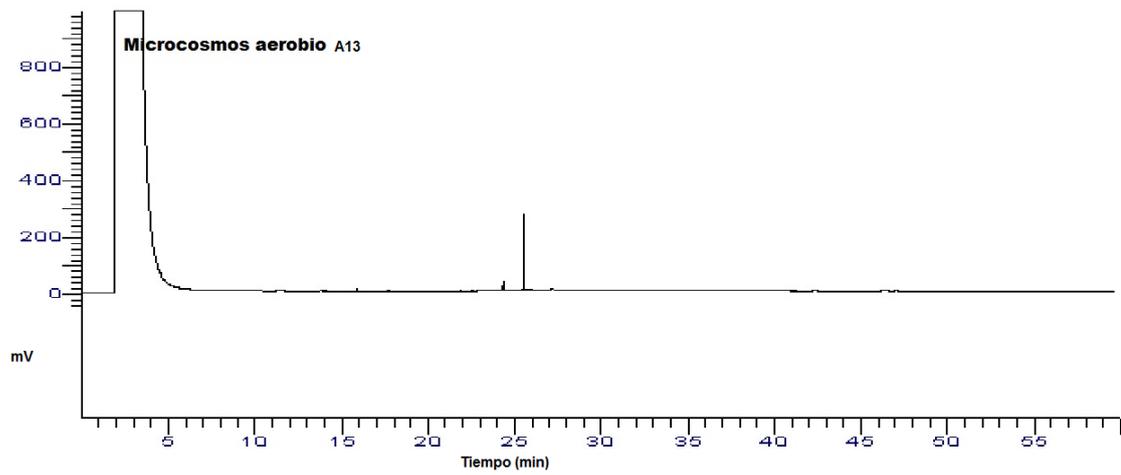
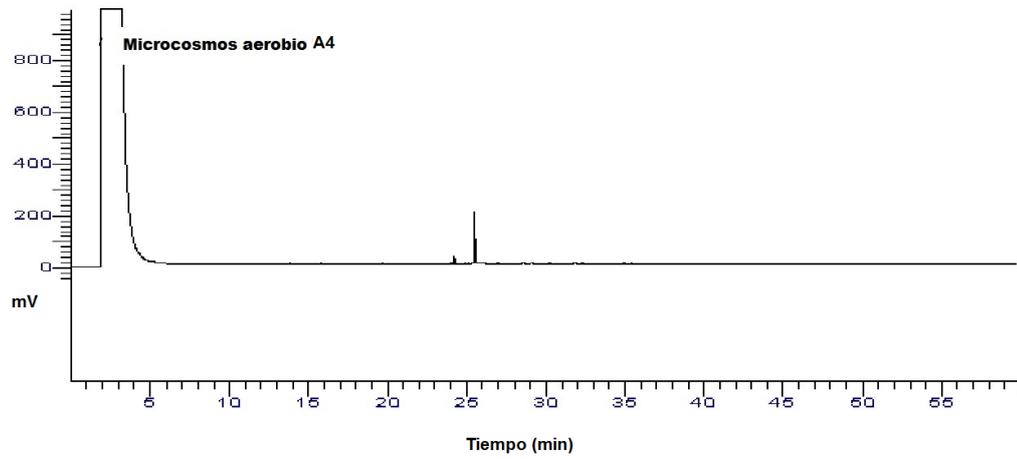
Este valor debe ser ajustado por el factor de dilución y el volumen de inóculo

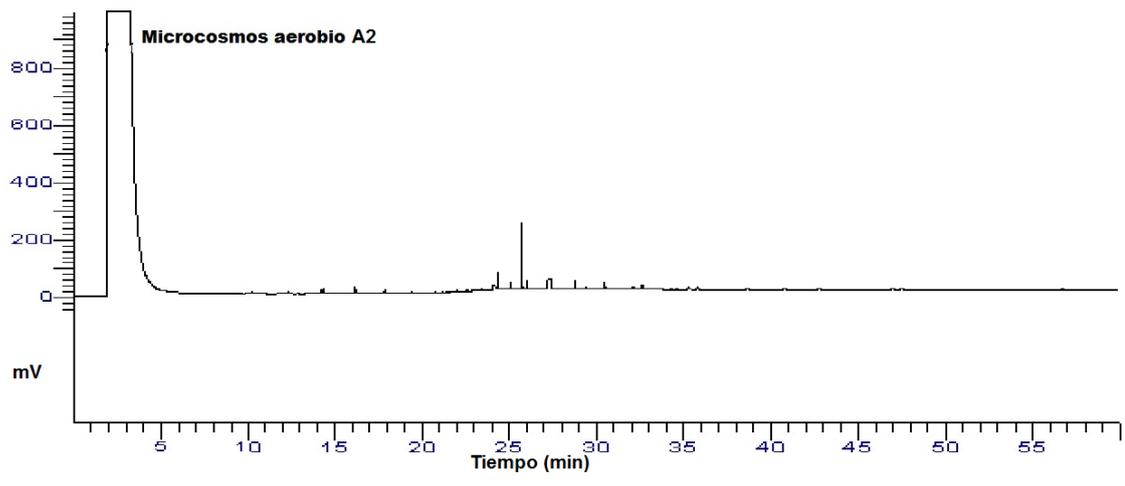
(por ejemplo, si se inoculó en cada placa un volumen de 10 μ l, entonces el valor de la tabla debe ser corregido multiplicándolo por 100 [10 X 100 = 1,000 μ l ó 1 mL]).

ANEXO 2: Tratamientos bajo condiciones aerobias vs. Tratamiento blanco.



ANEXO 3: Cromatogramas de tratamientos bajo condiciones aerobias después de 22 días de incubación.





ANEXO 4: Cromatogramas de tratamientos bajo condiciones anaerobias después de 22 días de incubación.

