



**ESPE**

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTOR: VALLE SUÁREZ MARIANA ANDREÍNA**

**TEMA: ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN  
DE PETRÓLEO CRUDO, A NIVEL DE LABORATORIO  
MEDIANTE BACTERIAS NATIVAS AISLADAS DE SUELOS DE  
LA PROVINCIA DE SUCUMBÍOS, CANTÓN LAGO AGRIO,  
ECUADOR.**

**DIRECTOR: KARINA PONCE B.Sc.  
CODIRECTOR: Dra. BLANCA NARANJO**

**SANGOLQUÍ, JUNIO 2014.**

## CERTIFICACIÓN

**Karina Ponce B.Sc.**

**Dra. Blanca Naranjo**

**Certifican:**

Que el trabajo titulado: ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE PETRÓLEO CRUDO, A NIVEL DE LABORATORIO MEDIANTE BACTERIAS NATIVAS AISLADAS DE SUELOS DE LA PROVINCIA DE SUCUMBÍOS, CANTÓN LAGO AGRIO, ECUADOR., ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas en el Reglamento de Estudiantes de la Universidad De Las Fuerzas Armadas – ESPE.

El mencionado trabajo consta de (un) documento empastado y (un) disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a MARIANA ANDREÍNA VALLE SUÁREZ que lo entregue a la Dra. MARÍA AUGUSTA CHÁVEZ en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, 19 de junio 2014.

---

Karina Ponce B.Sc.  
DIRECTOR

---

Dra. Blanca Naranjo  
CODIRECTOR

## **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD**

MARIANA ANDREÍNA VALLE SUÁREZ

Declaro que:

El proyecto de grado denominado ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE PETRÓLEO CRUDO, A NIVEL DE LABORATORIO MEDIANTE BACTERIAS NATIVAS AISLADAS DE SUELOS DE LA PROVINCIA DE SUCUMBÍOS, CANTÓN LAGO AGRIO, ECUADOR, ha sido desarrollado en base a una investigación exhaustiva, respetando los derechos intelectuales de terceros, conforme a las citas que constan en el texto cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía.

Consecuentemente este trabajo es de mi autoría

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 19 de Junio del 2014.

## AUTORIZACIÓN

MARIANA ANDREÍNA VALLE SUÁREZ

Autorizo que:

El proyecto de grado denominado ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE PETRÓLEO CRUDO, A NIVEL DE LABORATORIO MEDIANTE BACTERIAS NATIVAS AISLADAS DE SUELOS DE LA PROVINCIA DE SUCUMBÍOS, CANTÓN LAGO AGRIO, ECUADOR., sea publicado en la biblioteca virtual de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

Sangolquí, 19 de Junio del 2014.

-----  
Mariana A. Valle S.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de tesis, a Dios y a mi familia, especialmente a mis padres Ángel y Mariana, que durante toda mi vida me han brindado amor, cariño y apoyo incondicional; ayudándome constantemente para hacer posible mis metas y propósitos.

**Mariana Andreína Valle Suárez**

## **AGRADECIMIENTO**

Le agradezco a Dios que con su infinito amor me bendijo, fortaleció y me guió para con sabiduría poder culminar esta etapa de mi vida.

Quiero agradecer a mis padres por ser mi gran orgullo y ejemplo a seguir, ya que con sus valores engrandecieron mi corazón para ser una persona apasionada de lo que hace, pues con su apoyo he logrado una maravillosa formación.

A mis hermanos Fernando, Paco, Víctor, Slendy y Josué que siempre les tengo en mi mente por ser mis mejores amigos y compañeros; además por darme ánimos durante la elaboración de la tesis.

A Karina Ponce y Blanquita Naranjo por ser profesoras guías, amigas y disponer de su tiempo para direccionarme y orientarme durante la tesis.

Al Dr. Naga Raju Maddela por su tiempo, colaboración, excelente aporte y conocimiento, por estar pendiente siempre en el trabajo y por inculcar conocimientos con bases científicas.

Al Dr. Julio César Vargas Burgos, rector de la universidad Estatal Amazónica por darme apertura a realizar el trabajo de tesis en el laboratorio de biología de esta distinguida Institución.

**Andreína**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

|   |             |
|---|-------------|
| <b>CERTIFICACIÓN.....</b>                     | <b>I</b>    |
| <b>DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD .....</b>   | <b>II</b>   |
| <b>AUTORIZACIÓN .....</b>                     | <b>III</b>  |
| <b>DEDICATORIA.....</b>                       | <b>IV</b>   |
| <b>AGRADECIMIENTO .....</b>                   | <b>V</b>    |
| <b>ÍNDICE DE CONTENIDOS .....</b>             | <b>VI</b>   |
| <b>LISTADO DE TABLAS.....</b>                 | <b>IX</b>   |
| <b>LISTADO DE FIGURAS .....</b>               | <b>X</b>    |
| <b>SIGLAS Y ABREVIATURAS.....</b>             | <b>XI</b>   |
| <b>RESUMEN .....</b>                          | <b>XII</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>                         | <b>XIII</b> |
| <b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....</b>          | <b>1</b>    |
| <b>1.1 Formulación del problema .....</b>     | <b>1</b>    |
| <b>1.2 Justificación del problema.....</b>    | <b>2</b>    |
| <b>1.3 Objetivos de la investigación.....</b> | <b>3</b>    |
| 1.3.1 Objetivo General .....                  | 3           |
| 1.3.2 Objetivos Específicos .....             | 3           |
| <b>1.4 Marco Teórico .....</b>                | <b>4</b>    |
| 1.4.1 Petróleo .....                          | 4           |
| 1.4.2 El petróleo en Ecuador .....            | 7           |
| 1.4.3 Contaminación por petróleo .....        | 9           |

|  |           |
|--|-----------|
| 1.4.4 Microbiología del suelo.....   | 13        |
| 1.4.5 Biodegradación mediante bacterias .....  | 15        |
| <b>1.5 Hipótesis.....</b>  | <b>17</b> |
| <b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>   | <b>18</b> |
| <b>2.1 Participantes .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>2.2 Zona de estudio .....</b>   | <b>18</b> |
| 2.2.1 Fase de Campo.....   | 18        |
| 2.2.2 Fase de laboratorio .....  | 19        |
| <b>2.3 Periodo del tiempo de investigación.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>2.4 Diseño Experimental .....</b>   | <b>19</b> |
| <b>2.5 Procedimiento .....</b>   | <b>22</b> |
| 2.5.1 Muestreo y Transporte .....  | 22        |
| 2.5.2 Procesamiento de las muestras .....  | 22        |
| 2.5.3 Determinación de la cantidad de bacterias autóctonas presentes en el suelo contaminado con petróleo..... | 24        |
| 2.5.4 Inoculación de cultivos puros en caldos nutritivos.....  | 26        |
| 2.5.5 Aislamiento de bacterias degradadoras de petróleo, mediante técnica de enriquecimiento.....              | 26        |
| 2.5.6 Análisis de las características morfológicas .....   | 27        |
| 2.5.7 Preparación de stocks de glicerol.....   | 28        |
| 2.5.8 Análisis de los efectos de pH, temperatura, concentración y nutrientes sobre biodegradación .....        | 29        |
| 2.5.9 Análisis del crecimiento bacteriano durante el proceso de biodegradación.....                            | 32        |
| 2.5.10 Análisis de la biodegradación de petróleo crudo mediante cromatografía.....                             | 32        |
| <b>2.6 Análisis de Datos .....</b>   | <b>33</b> |
| 2.6.1 Interpretación .....   | 34        |
| <b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....</b>   | <b>35</b> |
| <b>3.1 Procesamiento de las muestras .....</b>   | <b>35</b> |
| <b>3.2 Cantidad de bacterias autóctonos presentes en el suelo contaminado con petróleo.....</b>                | <b>36</b> |
| <b>3.3 Aislamiento de bacterias degradadoras de petróleo.....</b>  | <b>36</b> |
| 3.3.1 Características morfológicas .....   | 37        |
| 3.3.2 Cepas con capacidad biodegradadora.....  | 37        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.4 Evaluación de los efectos de pH, temperatura, concentración del contaminante y nutrientes sobre biodegradación. ....</b> | <b>38</b> |
| 3.4.1 pH.....   | 38        |
| 3.4.2 Temperatura.....  | 40        |
| 3.4.3 Concentración del contaminante .....  | 42        |
| 3.4.4 Concentración de nutrientes.....  | 44        |
| <b>3.5 Crecimiento bacteriano durante el proceso de biodegradación. ....</b>  | <b>45</b> |
| <b>3.6 Resultados de la degradación del petróleo crudo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....</b>        | <b>48</b> |
| <b>CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN .....</b>  | <b>49</b> |
| <b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....</b>  | <b>54</b> |
| <b>CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES .....</b>  | <b>55</b> |
| <b>CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....</b>  | <b>56</b> |

## LISTADO DE TABLAS

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Tabla 1:</b>  | Composición elemental del petróleo.....   | 5  |
| <b>Tabla 2:</b>  | Niveles y tratamientos que se realizaron para cada factor. ....                                 | 20 |
| <b>Tabla 3:</b>  | Tabla de niveles, tratamientos y repeticiones realizados en la investigación. ....              | 21 |
| <b>Tabla 4:</b>  | Códigos de cada elemento determinado mediante fotometría.                                       | 23 |
| <b>Tabla 5:</b>  | Procedimiento para realizar tinción Gram. ....  | 28 |
| <b>Tabla 6:</b>  | Resultados de los análisis del suelo de la provincia de Sucumbíos. ....                         | 35 |
| <b>Tabla 7:</b>  | Resultados de la cantidad de UFC, presentes en cada muestra. ....                               | 36 |
| <b>Tabla 8:</b>  | Resultados de la tinción Gram. ....   | 37 |
| <b>Tabla 9:</b>  | Análisis de varianza de la evaluación del efecto pH.....  | 39 |
| <b>Tabla 10:</b> | Prueba de comparación de medias de Tukey del efecto pH. ...                                     | 39 |
| <b>Tabla 11:</b> | Análisis de varianza de la evaluación del efecto de la temperatura.....                         | 41 |
| <b>Tabla 12:</b> | Prueba de comparación de medias de Tukey del efecto de la temperatura.....                      | 41 |
| <b>Tabla 13:</b> | Análisis de varianza de la evaluación del efecto de la concentración del contaminante. ....     | 43 |
| <b>Tabla 14:</b> | Promedios para la interacción cepa y concentración del contaminante. ....                       | 43 |
| <b>Tabla 15:</b> | Análisis de varianza de la evaluación del efecto de nutrientes.                                 | 44 |
| <b>Tabla 16:</b> | Prueba de comparación de medias de Tukey para el efecto de la concentración de nutrientes. .... | 44 |

## LISTADO DE FIGURAS

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 1:</b>  | Cambio mínimo del proceso de biodegradación.....   | 16 |
| <b>Figura 2:</b>  | Fragmentación del proceso de biodegradación. ....  | 16 |
| <b>Figura 3:</b>  | Mineralización del proceso de biodegradación .....   | 17 |
| <b>Figura 4:</b>  | Fotografía de una muestra de suelo extendida en una bandeja, para ser sometida a secado, molienda y tamizado. ....   | 23 |
| <b>Figura 5:</b>  | Fotografía del procedimiento para determinación de diferentes compuestos químicos del suelo. A) Adición de la solución extractora: cloruro de sodio y bicarbonato de sodio. B) Filtración. C) Kits comerciales Merck. D) Reacción del extracto. E) Comparación de la reacción del extracto. F) Equipo Kjeldahl para determinar Nitrógeno. .... | 24 |
| <b>Figura 6:</b>  | Fotografía de la cámara de flujo laminar de clase II. ....   | 25 |
| <b>Figura 7:</b>  | Fotografía de los caldos nutritivos en matraces Erlenmeyer. ...  | 26 |
| <b>Figura 8:</b>  | Fotografía del agitador rotatorio con matraces Erlenmeyer. ....  | 27 |
| <b>Figura 9:</b>  | Fotografía. A) Frasco con petróleo crudo. B) Adición de petróleo crudo en los medios de cultivos. ....   | 30 |
| <b>Figura 10:</b> | Fotografía de los procedimientos para analizar el efecto de nutrientes. A) Frasco con NPK. B) Medio Mínimo de Sales Minerales con diferentes concentraciones de nutrientes. C) Medios con nutrientes, cepas y petróleo crudo. ....   | 31 |
| <b>Figura 11:</b> | Fotografía. A) Separación del petróleo crudo del medio y la suspensión bacteriana. B) Espectrofotómetro. ....  | 31 |
| <b>Figura 12:</b> | Tubos inclinados con las 6 cepas bacterianas aisladas.....   | 36 |
| <b>Figura 13:</b> | Fotografía de la tinción Gram. A) Cepa 3. B) Cepa 6. ....  | 37 |
| <b>Figura 14:</b> | Fotografías de las cepas con capacidad de biodegradar petróleo. A) Control y cultivo 3. B) Control y cultivo 6. C) Control y cultivo 3 y 6. D) Conservación de los cultivos bacterianos. ...   | 38 |
| <b>Figura 15:</b> | Evaluación del efecto de pH en la biodegradación de petróleo. ....   | 40 |
| <b>Figura 16:</b> | Evaluación del efecto de la temperatura en la biodegradación de petróleo. ....   | 42 |
| <b>Figura 17:</b> | Evaluación del efecto de la concentración del contaminante en la biodegradación de petróleo. ....  | 45 |
| <b>Figura 18:</b> | Fotografía del control y de los medios de cultivos con suspensión bacteriana durante la biodegradación de petróleo crudo. ....   | 46 |
| <b>Figura 19:</b> | Fotografía del conteo diario de unidades formadoras de colonias.....   | 46 |
| <b>Figura 20:</b> | Curva de crecimiento de las cepas bacterianas analizadas en el proceso de biodegradación.....  | 47 |
| <b>Figura 21:</b> | Análisis del porcentaje de biodegradación de petróleo crudo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia. ....  | 48 |

## SIGLAS Y ABREVIATURAS

|              |   |
|--------------|---|
| <b>HAPs</b>  | Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos           |
| <b>BTX</b>   | Benceno, Tolueno y Xileno                       |
| <b>CEPE</b>  | Corporación Estatal Petrolera Ecuatoriana       |
| <b>OPEP</b>  | Organización de países Exportadores de Petróleo |
| <b>OCP</b>   | Oleoducto de crudos pesados                     |
| <b>ITT</b>   | Ishpungo, Tambococha y Tiputini                 |
| <b>ADN</b>   | Ácido desoxirribonucleico                       |
| <b>ARN</b>   | Ácido ribonucleico                              |
| <b>DCA</b>   | Diseño Completamente al Azar                    |
| <b>ANOVA</b> | Análisis de varianza                            |
| <b>UFC</b>   | Unidades Formadoras de Colonias                 |
| <b>NPK</b>   | Nitrógeno, Fósforo y Potasio                    |
| <b>MSM</b>   | Medio Mínimo de Sales Minerales                 |
| <b>TPH</b>   | Hidrocarburos Totales de Petróleo               |
| <b>HPLC</b>  | High performance liquid chromatography          |
| <b>Ln</b>    | Logaritmo Natural                               |
| <b>gl</b>    | Grados de libertad                              |

## RESUMEN

En el presente estudio se analizó y evaluó la biodegradación de petróleo crudo mediante bacterias nativas de suelos del cantón Lago Agrio, provincia de Sucumbios. Las muestras de suelo se tomaron de sectores contaminados y fueron sometidas a procesos de secado bajo sombra y tamizado; se realizó el estudio de las propiedades físico químicas usando kits comerciales de Merck. Se obtuvieron seis cepas bacterianas en total, de las cuales, dos (cepa 3 y 6) fueron capaces de biodegradar petróleo; identificadas como cocos Gram positivos, almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en 25 % de glicerol. A partir de entonces las bacterias se cultivaron en el medio mínimo de sales minerales (MSM) adicionando petróleo como única fuente de carbono, en la evaluación de los efectos de factores ambas bacterias mostraron un crecimiento óptimo a pH 6 y concentración de sustrato 2 %. Sin embargo, el cultivo 3 tuvo la capacidad de tolerar una temperatura más baja y nutrientes más altos (NPK) sobre la cepa 6.

Según la curva de crecimiento, las dos cepas en asociación presentaron un crecimiento rápido y por lo tanto, una mayor biodegradación de petróleo crudo. Finalmente la capacidad de biodegradación de petróleo fue determinada usando cromatografía HPLC (High performance liquid chromatography). Los cultivos bacterianos 3 y 6 degradaron el 23,15 y 16,5 % del crudo en 10 días, respectivamente. Sin embargo, más del 90 % de degradación se alcanzó en 40 días cuando se adicionó al medio nutrientes en forma de NPK.

Se recomienda usar las cepas 3 y 6 que tuvieron la mejor capacidad de biodegradar petróleo, para realizar próximos estudios a pequeña escala de biorremediación de suelos.

**Palabras claves:** BIODEGRADACIÓN, EVALUACIÓN, BACTERIAS AUTÓCTONAS, PETRÓLEO CRUDO, CONTAMINACIÓN.

## ABSTRACT

In the present study, analyzed and evaluated the biodegradation of crude oil by native bacteria of soils from Lago Agrio in Sucumbíos province. Soil samples were collected from areas contaminated and subjected to shade drying; sieve and different physicochemical properties have been determined by using standard procedures of Merck. A total of six bacterial strains; however, two of the cultures (3 and 6) were able to biodegrade oil; identified as Gram positive, stored at - 80 ° C in 25% glycerol. Thereafter, bacteria were cultured in minimal salts medium (MSM) containing crude oil as a sole carbon source, in effects evaluation both bacteria showed optimum growth at pH 6 and 2% substrate concentration. However, the culture 3 has capacity to tolerate lower temperature and higher nutrients (N, P, and K) over culture 6. According to the growth curve, the two associated strains showed rapid growth and thus higher crude oil biodegradation. Finally the oil biodegradability was determined using HPLC (high performance liquid chromatography) techniques. Bacterial cultures 3 and 6 biodegraded 23.15 and 16.5% of crude oil in 10 days, respectively. However, >90% degradation was achieved in 40 days when medium was incorporated with nutrients in the form of N, P and K.

The culture 3 and 6 are recommended to be use, which had the best ability to biodegrade crude oil for studies further of small- scale soil bioremediation.

**Keywords:** BIODEGRADATION, EVALUATION, INDIGENOUS BACTERIA, CRUDE OIL, CONTAMINATION.

# **CAPÍTULO 1:**

## **INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Formulación del problema**

La contaminación ambiental es un problema crítico actualmente, se produce como resultado de las actividades productivas del hombre, en donde el intenso aprovechamiento y transformación de recursos provocan severas alteraciones al ambiente (Romero, 2010).

Los derrames de hidrocarburos de petróleo son las principales fuentes de contaminación de suelo y agua, provocando perturbaciones en los ecosistemas, afectando su estructura y bioprocesos (Zamora, Ramos, & Arias, 2012).

La producción de petróleo es la industria más grande y rentable del mundo, donde los productos de las refinerías son muy útiles y se han convertido en necesidades de la sociedad moderna; sin embargo, cuando el petróleo se maneja inadecuadamente, puede ser extremadamente peligroso para el ambiente y la salud humana (Mrozik, Piotrowska, & Labuzek, 2002).

En Ecuador, el petróleo, conocido como oro negro, constituye el hidrocarburo que se explota diariamente, ya que, es la fuente más importante

de exportación y tiene una relación directa con la economía (Baker, Caisse, & Johnson, 2009).

La explotación petrolera en Ecuador, ha producido grandes problemas ambientales, ya que, desde tiempos remotos las empresas petroleras han tenido un inadecuado manejo y disposición del petróleo (Camino, 2003).

La contaminación de petróleo destruye suelos, ríos, arroyos e incluso aguas subterráneas, repercutiendo sobre la biodiversidad (Baker, Caisse, & Johnson, 2009). (Di & Vicién, 2010)

## **1.2 Justificación del problema**

Ecuador es un país que cuenta con el privilegio de tener gran biodiversidad de flora y fauna; sin embargo es lamentable el caos ambiental producido por los derrames de petróleo; constituyendo un problema alarmante, que abre las puertas para buscar soluciones, aplicando procesos biotecnológicos como la biodegradación, mediante el empleo de microorganismos (Di & Vicién, 2010).

La Biorremediación es una tecnología biotecnológica, que juega un papel importante ante la necesidad de reparar el impacto negativo producido por derrames de petróleo en diversos ambientes como suelos y aguas; a través de microorganismos con capacidad degradadora; con la finalidad de restaurar la calidad ambiental, solucionando los problemas ambientales y por ende evitando diversas enfermedades que ha sufrido la población local (Ñutez, 2012).

Las investigaciones de Biorremediación en el país son escasas; en los años ochenta se desarrolló uno de los primeros estudios, denominado PETRAMAZ; con el aporte económico Petroecuador y ONGs europeas; con el propósito de remediar algunos lugares de la Amazonía ecuatoriana. Actualmente cada industria se responsabiliza por la contaminación provocada por hidrocarburos (Cando, 2011).

El objetivo de esta investigación fue analizar y evaluar la biodegradación de petróleo crudo, utilizando bacterias nativas de suelos contaminados del cantón Lago Agrio; teniendo en cuenta conocimientos biotecnológicos para determinar los valores óptimos de biodegradación de petróleo a nivel de laboratorio, con la finalidad de generar a futuro estudios que permitan biorremediar suelos contaminados a gran escala, mejorando así los ecosistemas.

### **1.3 Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1 Objetivo General**

Analizar y evaluar la biodegradación de petróleo crudo, a nivel de laboratorio mediante bacterias nativas aisladas de suelos de la provincia de Sucumbíos, cantón Lago Agrio, Ecuador.

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Determinar la cantidad de bacterias autóctonas presentes en el suelo contaminado con petróleo.

- Aislar y caracterizar bacterias autóctonas presentes en el suelo contaminado con petróleo.
- Evaluar los efectos de pH, temperatura, concentración y nutrientes en la biodegradación del petróleo.
- Analizar la biodegradación de petróleo crudo ejercida por las bacterias, mediante cromatografía.

## **1.4 Marco Teórico**

### **1.4.1 Petróleo**

El petróleo es denominado, como oro negro, aceite de piedra, aceite noble, aceite negro; debido a sus términos que son de origen latino; *petra* que quiere decir piedra y *oleum*, aceite (Mitja, y otros, 2002). Es un combustible natural, de origen fósil; originado de la descomposición de la materia orgánica, viscoso y constituido por miles de hidrocarburos (Torres & Zuluaga, 2009).

#### **1.4.1.1 Composición del petróleo**

El petróleo está formado por hidrocarburos, cuyos átomos de carbono pueden adoptar diferentes estructuras, ya sea cadenas largas o cortas. Pueden combinarse con compuestos sulfurados, nitrogenados de carácter orgánico, oxigenados como ácidos grasos, y otros elementos: oxígeno, vanadio, níquel, sales minerales, etc., adoptando estructuras más complejas (Silos, 2008). En la tabla 1 tomado de Silos, 2008 se muestra la composición elemental del petróleo crudo.

**Tabla 1:** Composición elemental del petróleo.

| Elemento         | Rango % | Típico % |
|------------------|---------|----------|
| <b>Carbono</b>   | 85 – 95 | 85       |
| <b>Hidrógeno</b> | 5 – 15  | 13       |
| <b>Azufre</b>    | < 5     | 1,3      |
| <b>Oxígeno</b>   | <2      | 0,5      |
| <b>Nitrógeno</b> | < 0,9   | 0,5      |
| <b>Metales</b>   | < 0,1   |          |

El petróleo se constituye de cuatro fracciones: hidrocarburos saturados, aromáticos, asfaltenos y resinas (Echeverri, Manjarrez, & Cabrera, 2010). De estos, los hidrocarburos saturados son los más importantes (Silos, 2008)

#### 1.4.1.1.1 Hidrocarburos saturados

Denominados también como alcanos o parafinas. En estas moléculas los átomos de carbono están unidos por enlaces sencillos normales, es decir, el carbono se presenta tetravalente y todos los enlaces libres están saturados con átomos de hidrógeno (Primo, 1999).

#### 1.4.1.1.2 Hidrocarburos aromáticos

Son hidrocarburos insaturados, que presentan uno o más anillos bencénicos en su molécula, en forma de anillo hexagonal, denominándolos como monoaromáticos, diaromáticos y poliaromáticos (HAPs). El benceno (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>), es considerado como el cuerpo fundamental de la mayoría de los compuestos aromáticos (Castro, 2007).

Su nombre se debe al fuerte y agradable olor de algunos de sus compuestos, siendo los más importantes, el benceno, tolueno y xileno,

conocidos como grupo BTX, así como el antraceno y naftaleno, considerados como tóxicos y de difícil biodegradación (Castro, 2007).

#### **1.4.1.1.3 Resinas**

Las resinas son fracciones pesadas del petróleo formadas por moléculas piridínicas, carbazoles, quinolinas, sulfóxidos, tiofenos y aminas. (Fernández, y otros, 2006).

Tienen propiedad estabilizadora sobre los asfaltenos, y se los analiza mediante floculación; las resinas son absorbidas sobre estos formando una capa que los protege y mantiene en suspensión coloidal (Navarro, Álvarez, Grosso, & Navarro, 2004).

#### **1.4.1.1.4 Asfaltenos**

Los asfaltenos están conformados por 4 a 20 anillos aromáticos (Delgado, 2006). Contienen moléculas de oxígeno, nitrógeno y azufre, caracterizadas como estructuras complejas, que se pueden unir por cadenas alifáticas de diferente longitud; tienen mayor peso molecular, por lo tanto, mayor aromaticidad (Pineda, Boll, & Mesta, 2002).

Se identifican por ser recalcitrantes, difíciles de degradar debido a su composición de cadenas complejas, siendo persistentes en el ambiente (Fernández, y otros, 2006).

### 1.4.2 El petróleo en Ecuador

La exploración petrolera en la Amazonía ecuatoriana empieza en la década de los cincuenta, a partir de la identificación de yacimientos de crudo pesado en la zona norte; donde Sucumbíos y Orellana estaba habitada por sionas, cofanes y tetetes, nacionalidades nada guerreras, que permitieron el ingreso a las exploraciones, encontrando petróleo liviano de muy buena calidad, y accesible (Vogliano, 2009).

El petróleo fue descubierto a finales de la década de los años sesenta por la empresa norteamericana Texaco, que desarrolló en 1967 el primer yacimiento en la Amazonía, denominado Lago Agrio. A partir de 1972 se transportó el petróleo por oleoducto transecuatoriano hacia el puerto de Balao en Esmeraldas. El mismo año salió, el primer cargamento de crudo amazónico hacia los mercados mundiales; convirtiéndose en la operadora de todo el territorio durante 30 años (Narváez, 2009).

La dictadura militar del general Rodríguez creó la Corporación Estatal Petrolera Ecuatoriana (CEPE), con el fin de desarrollar leyes para explorar hidrocarburos y comercializar los productos necesarios de la actividad petrolera (Carrera, 2008).

En el año de 1989, CEPE fue reemplazada por PETROECUADOR, conformando matrices de producción, industrialización, transporte; donde Petrocomercial, se constituyó como matriz permanente (Carrera, 2008).

A inicios de la década de los noventa se abrieron nuevas licitaciones, con el fin de implementar los bloques 20, 23 y 24 hacia Pastaza y Morona Santiago, sin embargo, los pueblos indígenas kichwas de Pastaza, particularmente Sarayaku, Shuar y Achuar impusieron su resistencia (Narváez, 2009).

Desde el año 2000 al 2005 se planificaron proyectos, cumpliendo con la construcción del oleoducto de crudos pesados (OCP). En el 2006 se estableció la reforma a la ley de hidrocarburos con el propósito de conseguir un mayor porcentaje de ganancias en los bloques petroleros, ya que el Estado ecuatoriano se quedaba tan solo con el 20 % en el mejor de los casos (Narváez, 2009).

En el 2008, el presidente Correa tomó la decisión de mantener el crudo del campo ITT bajo tierra, ya que, las grandes reservas de crudos pesados se encuentran ubicados en el interior del Parque Nacional Yasuní, una reserva que encierra la mayor concentración de biodiversidad del planeta (Larrea, 2010).

En el 2013, pone fin a la iniciativa Yasuní ITT y ratifica su explotación, aduciendo que afectará a menos del uno por mil de la Reserva de Biósfera del Yasuní (Universo, 2013).

Petroecuador, actualmente realiza sus actividades hidrocarburíferas en 10 campos petroleros, usando aproximadamente 700.000 ha. de la región amazónica del Ecuador (Herreo, y otros, 2012)

### 1.4.3 Contaminación por petróleo

La contaminación surge como consecuencia de la presencia o incorporación de sustancias o agentes, perjudiciales para todos los seres vivos. La de mayor importancia es aquella que afecta a los recursos naturales: aire, agua y suelo (Orellana, 2005).

Como la fuente más frecuente de contaminación de suelos se encuentra, la actividad humana de forma voluntaria o accidental a través de diferentes factores, entre ellos: derrames de petróleo (Coria, 2007).

La explotación de petróleo ha generado beneficios económicos para el gobierno de Ecuador, sin embargo su contaminación desde tiempos remotos ha ocasionado grandes catástrofes ambientales (Baker, Caisse, & Johnson, 2009).

Las petroleras se caracterizan por ser las industrias que más impactos ambientales generan en los diferentes procesos de explotación y prácticas operacionales; provocando deforestación, pérdida de hábitat, poniendo en peligro las especies de flora y fauna y fragmentando la unidad eco sistémica que pueden inducir al ausentamiento faunístico (Bravo, 2007).

El vertido de hidrocarburos totales de petróleo, es uno de los problemas de contaminación más importantes a nivel mundial, el que se da durante los procesos de embarque, desembarque, operaciones, actividades de extracción, transporte, almacenamiento y refinamiento (Vallejo, Salgado, & Roldan, 2005).

La empresa Texaco entre 1972 y 1992, extrajo 1.5 mil millones de barriles de petróleo; deliberadamente vertió 19 mil millones galones de residuos y derramó 17 millones de galones (Camino, 2003). Dejó más de 18 mil millones de galones de aguas residuales tóxicas en la selva amazónica ecuatoriana; motivo por el cual el caso Texaco – Chevron fue nombrado por los expertos como el Chernobyl del bosque lluvioso "Rain forest Chernobyl" (Baker, Caisse, & Johnson, 2009).

La contaminación con hidrocarburos en diferentes ecosistemas se ha incrementado en los últimos años debido al aumento en la actividad de exploración y producción de la industria petrolera. En la actualidad los suelos contaminados representan el 70 % del total de los ecosistemas impactados (Ortiz, y otros, 2005).

El impacto generado por derrames petroleros pueden causar problemas sobre una escala de tiempo, desde días, años e incluso décadas; dependiendo del tamaño, tasa y ubicación; sin embargo, a menor dimensión puede causar daños significativos a ecosistemas y poblaciones enteras (Ramseur, 2012).

Generalmente todas las actividades que se encuentran relacionadas con la exploración del petróleo, ocasionan impactos potencialmente negativos sobre el medio ambiente y provocan serias enfermedades a las personas que están en contacto continuo con él (Torres & Zuluaga, 2009).

### **1.4.3.1 Efectos de la contaminación de petróleo**

Los efectos se expresan en la contaminación del agua, aire y suelos, generando daños al ecosistema y provocando problemas en la salud humana.

#### **1.4.3.1.1 Efectos sobre el ambiente**

La explotación petrolera ha provocado diferentes efectos sobre el ambiente, generando impactos perjudiciales y ocasionando un desequilibrio ambiental (Bravo, 2007).

Las actividades petroleras, a partir de la realización de trochas y helipuertos provocan deforestaciones, contaminación de suelos, ríos; cuyas consecuencias son el ausentamiento, muerte de animales y afección al ecosistema (Ortíz, Salvador, Vásquez, & Delgado, 2009).

La prospección sísmica y perforación tiene como resultado la erosión del suelo y pérdida de minerales. El ruido de las turbinas de las plataformas, taladros y quema de gases en los mecheros provocan una contaminación atmosférica (Ortíz, Salvador, Vásquez, & Delgado, 2009).

Los problemas ambientales ocasionados por la actividad petrolera, se muestran a través del deterioro, pérdida de los recursos renovables y no renovables, los cuales tienen mayor incidencia a nivel local (Bustamante & Jarrín, 2004).

#### **1.4.3.1.2 Efectos sobre la salud humana**

La contaminación ambiental repercute sobre las comunidades vecinas de los campos petroleros, provocando enfermedades perjudiciales para la salud (Rourke, 2010). El agua de los ríos y/o arroyos que usan para su aseo personal, beber, cocinar, lavar ropa; generan problemas por ingesta, aspiración o contacto (Sebastian, Armstrong, Córdova, & Stephens, 2005).

La ingesta de petróleo afecta al sistema respiratorio, nervioso y gastrointestinal; generando síntomas como náuseas, malestar intestinal, tos y ronquera. La toxicidad del pulmón se da por la aspiración de los hidrocarburos cuando su viscosidad es baja y la volatilidad alta. Los problemas de irritación de ojos y piel se asocia al contacto con hidrocarburos aromáticos policíclicos (Castro, 2007).

Los efectos sobre la salud son debido a que el petróleo contiene compuestos químicos, nocivos y tóxicos, destacándose los hidrocarburos aromáticos, policíclicos y volátiles (Jacott, Arias, Guzmán, & Franco, 2011).

La consecutiva exposición de Hidrocarburos aromáticos policíclicos originan cáncer de piel y pulmón; los compuestos orgánicos volátiles como el benceno, produce leucemia y trastornos hematológicos (Sebastian, Armstrong, Córdova, & Stephens, 2005). El xileno ocasiona irritación de ojos, nariz, garganta y tracto respiratorio, mientras, el tolueno se absorbe rápidamente por el sistema respiratorio induciendo a problemas de confusión mental, insomnio, dolores de cabeza y debilitamiento muscular (Jacott, Arias, Guzmán, & Franco, 2011).

#### **1.4.4 Microbiología del suelo**

##### **1.4.4.1 El suelo**

El suelo es un recurso natural que abarca la parte más externa de la corteza terrestre; resultado de la transformación de sustancias orgánicas y minerales; compuesto de una fase sólida, líquida y gaseosa, constituyendo el soporte mecánico y sustento de las plantas (Juárez, Sánchez, & Sánchez, 2006); (Nogales, 2005).

En el suelo existen organismos demasiados pequeños, llamados microorganismos, que descomponen la materia orgánica y permiten el ciclado de nutrientes; de los cuales depende el crecimiento de la flora (Labrador, 2006).

##### **1.4.4.2 Microorganismos**

Los microorganismos son organismos microscópicos, los más primitivos y numerosos de la tierra, funcionan como poblaciones y juegan papeles beneficiosos y vitales para el ambiente; sin embargo, también pueden causar enfermedades (Montaño, Sandoval, Camargo, & Sánchez, 2010).

A medida que interactúan con otros organismos y el ambiente, contribuyen en el funcionamiento de los ecosistemas, ya que, tienen la capacidad de realizar innumerables procesos biológicos y biotecnológicos (Frioni, 1999).

Se clasifican según su organización celular en dos categorías; microorganismos con y sin organización celular (Montaño, Sandoval, Camargo, & Sánchez, 2010).

#### **1.4.4.2.1 Microorganismos con organización celular**

A esta categoría pertenecen los organismos eucariotas y procariotas.

Las eucariotas tienen un núcleo, cuyo contenido es de material genético separado por el citoplasma; mitocondrias y cloroplastos, limitados por membranas. Forman parte de este grupo los protozoarios, algas y hongos (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009).

Los procariotas son más abundantes y sencillos que los eucariotas, ya que existe una carencia de características estructurales y sistemas membranosos, no presentan núcleo, la división es por fisión binaria, tienen pared celular que contiene peptidoglicano; se incluyen en este grupo, las *Archaeas* y *Bacterias* (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2008).

Las bacterias son microorganismos unicelulares, su tamaño medio está entre 0,5 micrómetros, considerados ubicuos, ya que se los encuentra en todos los lugares del planeta, algunos pueden vivir en condiciones extremas, existiendo diferentes tipos (Guerrero & Berlanga, 2006). Pueden presentar forma de coco dispuestos como diplococos, estreptococos, estafilococos, sarcinas, tétradas y bacilos que son bastones alargados y cilíndricos (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2008).

#### **1.4.4.2 Microorganismos sin organización celular**

Son virus, viroides y priones, considerados como agentes infecciosos, aquellos que no poseen membrana, ni peptidoglicanos, el material genético ADN y ARN nunca se presentan juntos y carecen de actividad metabólica cuando están libres (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009).

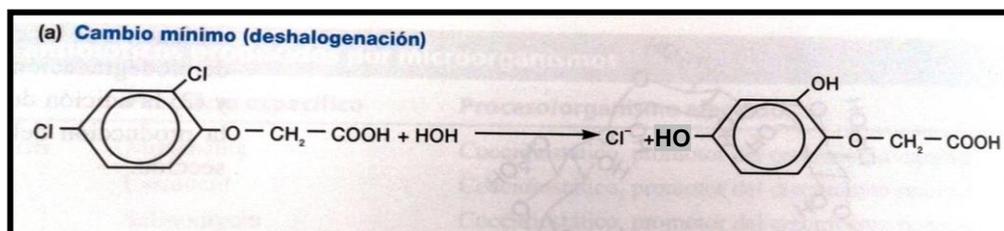
#### **1.4.5 Biodegradación mediante bacterias**

El suelo es un complejo y heterogéneo sistema y hábitat favorable para la proliferación de bacterias, cuyo crecimiento se desarrolla en las superficies de partículas, algunas son autóctonas, por lo que pueden sobrevivir, crecer y realizar sus actividades metabólicas, presentando características adaptivas que las hacen fisiológicamente compatibles con su ambiente físico y químico (Atlas & Bartha, 2002). La actividad de las bacterias, se da mediante reacciones bioquímicas que pueden tener la capacidad de biodegradar petróleo (Atlas & Bartha, 2002).

La biodegradación disminuye la concentración de un contaminante a formas más simples, mediante la transformación catalizada biológicamente por microorganismos de sustancias a anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>), agua o biomasa, este proceso se da mediante etapas como la deshalogenación, fragmentación y mineralización (Solanas, 2009).

Deshalogenación, genera un cambio mínimo en los grupos funcionales unidos a la molécula orgánica, dejando intacta la estructura principal y al mismo

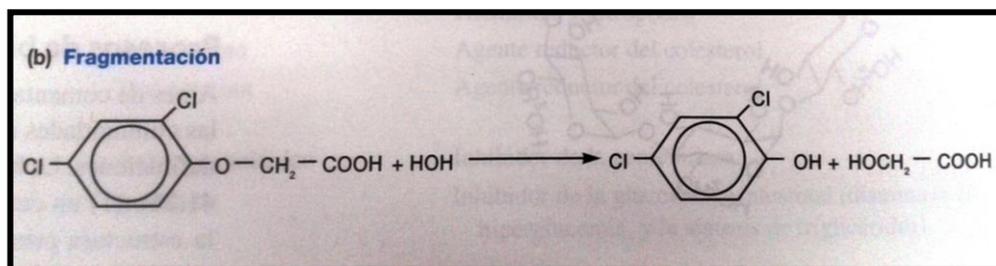
tiempo añade electrones. En la figura 1 tomada de (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2008), se indica la reacción.



**Figura 1:** Cambio mínimo del proceso de biodegradación.

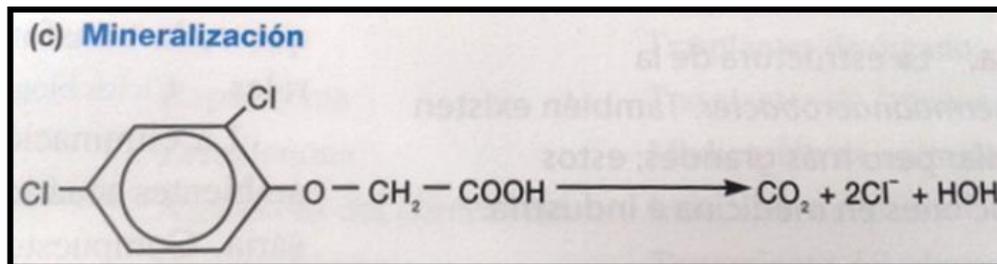
Se da mediante dos formas: hidrogenólisis, el sustituyente halógeno se reemplaza por un átomo de hidrógeno y dihaloeliminación que elimina dos sustituyentes halógenos de carbonos adyacentes, mientras inserta un enlace adicional entre carbonos (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2008).

La fragmentación, es la rotura de un compuesto en otros fragmentos orgánicos de manera que la molécula orgánica podría ser reconstruida. La figura 2 muestra el proceso (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2008).



**Figura 2:** Fragmentación del proceso de biodegradación.

Mineralización, es la degradación completa, donde se transforman de moléculas orgánicas a formas minerales (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2008).



**Figura 3:** Mineralización del proceso de biodegradación (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2008).

### 1.5 Hipótesis

La presencia de bacterias degradadoras de petróleo crudo es estadísticamente significativa.

## **CAPÍTULO 2:**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 Participantes**

La Universidad Estatal Amazónica (UEA), a través del laboratorio de Biología, en el que se realizaron las actividades experimentales y desarrollo investigativo.

Karina Ponce B.Sc. y Dra. Blanca Naranjo, como directora y co directora de la tesis respectivamente de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE; Dr. Naga Raju Maddela, tutor institucional de la UEA, quien orientó el trabajo científico de la investigación.

#### **2.2 Zona de estudio**

##### **2.2.1 Fase de Campo**

Las muestras de suelo fueron tomadas del cantón Lago Agrio, de la Provincia Sucumbíos, ubicado al noroeste de la región amazónica del Ecuador, cuyas coordenadas son 10001527,083 N; 974576,881 E.

### **2.2.2 Fase de laboratorio**

El trabajo de investigación experimental se realizó en el Laboratorio de Biología de la Universidad Estatal Amazónica, que se encuentra en la Provincia Pastaza, Campus Puyo, con dirección Km. 2 1/2 Vía Napo (Paso Lateral).

### **2.3 Periodo del tiempo de investigación**

El trabajo de tesis “Análisis y evaluación de la biodegradación de petróleo crudo, a nivel de laboratorio mediante bacterias nativas aisladas de suelos de la provincia de Sucumbíos, cantón Lago Agrio, Ecuador” se llevó a cabo desde el 15 de julio del 2013 hasta el 7 de febrero del 2014.

### **2.4 Diseño Experimental**

Los datos de esta investigación fueron cualitativos analizados mediante la caracterización morfológica de las bacterias y cuantitativos sometidos a estadística con un diseño completamente al azar (DCA).

A partir del diseño factorial se estableció las condiciones efectivas para el proceso biodegradativo desarrollado gracias al crecimiento bacteriano, mediante el análisis de parámetros como: concentración del contaminante, temperatura, pH y nutrientes, considerándose como factores del diseño.

Cada factor y tratamiento tuvo tres repeticiones, de esta manera se establecieron un total de 120 observaciones, con la finalidad de constituir estadísticamente los parámetros favorables y efectivos para llevar a efecto una biodegradación óptima de petróleo generada por bacterias, por lo tanto, la

variable de respuestas se analizó mediante el conteo de UFC y se transformó a logaritmo natural en el programa InfoStat. En la tabla 2 se indica los niveles y tratamientos.

**Tabla 2:** Niveles y tratamientos que se realizaron para cada factor.

| Factores                      |           | Tratamientos | Niveles |
|-------------------------------|-----------|--------------|---------|
| <b>Temperatura</b>            | Cultivo 3 | T1           | 8 °C    |
|                               |           | T2           | 25 °C   |
|                               |           | T3           | 37°C    |
|                               | Cultivo 6 | T1           | 8 °C    |
|                               |           | T2           | 25 °C   |
|                               |           | T3           | 37°C    |
| <b>pH</b>                     | Cultivo 3 | T1           | 2       |
|                               |           | T2           | 4       |
|                               |           | T3           | 6       |
|                               |           | T4           | 7.5     |
|                               |           | T5           | 8       |
|                               |           | T6           | 10      |
|                               | Cultivo 6 | T1           | 2       |
|                               |           | T2           | 4       |
|                               |           | T3           | 6       |
|                               |           | T4           | 7.5     |
|                               |           | T5           | 8       |
|                               |           | T6           | 10      |
| Factores                      |           | Tratamientos | Niveles |
| <b>Concentración</b>          | Cultivo 3 | T1           | 0.5 %   |
|                               |           | T2           | 1%      |
|                               |           | T3           | 1.5%    |
|                               |           | T4           | 2%      |
|                               |           | T5           | 2.5%    |
|                               | Cultivo 6 | T1           | 0.5 %   |
|                               |           | T2           | 1%      |
|                               |           | T3           | 1.5%    |
|                               |           | T4           | 2%      |
|                               |           | T5           | 2.5%    |
| <b>Nutrientes :<br/>N P K</b> | Cultivo 3 | T1           | 2 g/L   |
|                               |           | T2           | 4 g/L   |
|                               |           | T3           | 6g/L    |
|                               | Cultivo 6 | T1           | 2 g/L   |
|                               |           | T2           | 4 g/L   |
|                               |           | T3           | 6g/L    |

A continuación se muestra una tabla de las repeticiones analizadas por cada tratamiento.

**Tabla 3:** Tabla de niveles, tratamientos y repeticiones realizados en la investigación.

| Factores              |           | Tratamientos | Niveles | Repeticiones |
|-----------------------|-----------|--------------|---------|--------------|
| <b>Temperatura</b>    | cultivo 3 | T1           | 8 °C    | 3            |
|                       |           | T2           | 25 ° C  | 3            |
|                       |           | T3           | 37°C    | 3            |
|                       | cultivo 6 | T1           | 8 °C    | 3            |
|                       |           | T2           | 25 °C   | 3            |
|                       |           | T3           | 37°C    | 3            |
| <b>pH</b>             | cultivo 3 | T1           | 2       | 3            |
|                       |           | T2           | 4       | 3            |
|                       |           | T3           | 6       | 3            |
|                       |           | T4           | 7.5     | 3            |
|                       |           | T5           | 8       | 3            |
|                       |           | T6           | 10      | 3            |
|                       | cultivo 6 | T1           | 2       | 3            |
|                       |           | T2           | 4       | 3            |
|                       |           | T3           | 6       | 3            |
|                       |           | T4           | 7.5     | 3            |
|                       |           | T5           | 8       | 3            |
|                       |           | T6           | 10      | 3            |
| <b>Concentración</b>  | cultivo 3 | T1           | 0.5 %   | 3            |
|                       |           | T2           | 1%      | 3            |
|                       |           | T3           | 1.5%    | 3            |
|                       |           | T4           | 2%      | 3            |
|                       |           | T5           | 2.5%    | 3            |
|                       | cultivo 6 | T1           | 0.5 %   | 3            |
|                       |           | T2           | 1%      | 3            |
|                       |           | T3           | 1.5%    | 3            |
|                       |           | T4           | 2%      | 3            |
|                       |           | T5           | 2.5%    | 3            |
| <b>Nutrientes NPK</b> | Cultivo 3 | T1           | 2 g/L   | 3            |
|                       |           | T2           | 4 g/L   | 3            |
|                       |           | T3           | 6g/L    | 3            |
|                       | Cultivo 6 | T1           | 2 g/L   | 3            |
|                       |           | T2           | 4 g/L   | 3            |
|                       |           | T3           | 6g/L    | 3            |
| <b>TOTAL</b>          |           | T = 34       | N= 34   | R= 102       |

Observaciones = tratamiento x repeticiones

Observaciones = 34 x 3

Observaciones = 102

De cada tratamiento se obtuvieron datos, elegidos como los mejores resultados para interpretar y discutir la capacidad de biodegradar petróleo crudo.

## **2.5 Procedimiento**

### **2.5.1 Muestreo y Transporte**

Se tomaron las muestras en fundas plásticas nuevas y limpias, muestreando representativamente la superficie, cada una constituyó una cantidad determinada de microorganismos, las que se obtuvieron de diferentes puntos del área analizada visualmente y según criterio técnico (Bannert, y otros, 2001).

Las muestras tomadas fueron etiquetadas y colocadas en una hielera portátil, junto con el medio refrigerante para ser transportadas hasta el laboratorio de Biología de la Universidad Estatal Amazónica (Marín, 2003)

### **2.5.2 Procesamiento de las muestras**

Las muestras recolectadas fueron sometidas a secado bajo sombra, y posteriormente, a procesos de molienda y tamizado. Finalmente se almacenaron a temperatura de 4 °C, hasta realizar los análisis físicos y químicos (Marín, 2003).

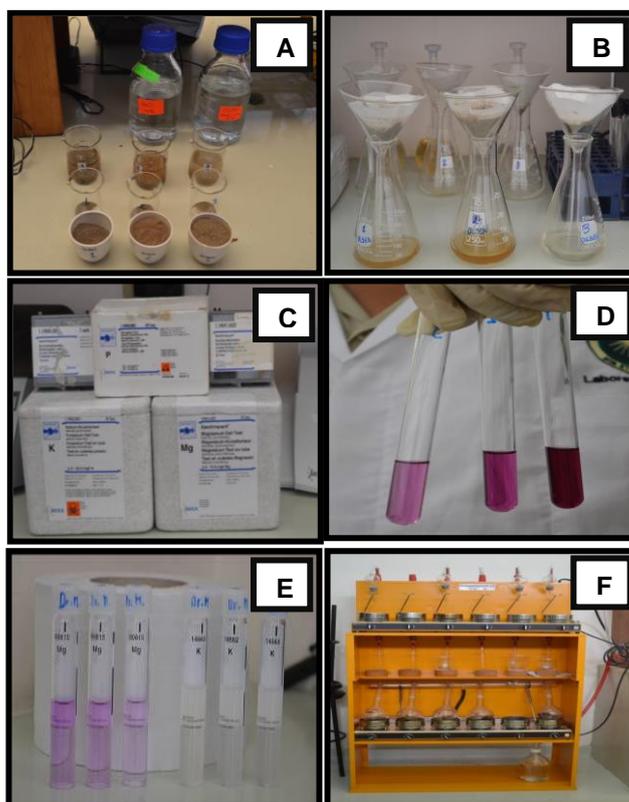


**Figura 4:** Fotografía de una muestra de suelo extendida en una bandeja, para ser sometida a secado, molienda y tamizado.

Se determinó pH, a través del método potenciométrico; conductividad eléctrica mediante conductimetría, materia orgánica por Walkley black, nitrógeno a través de Kjeldahl, contenido de fósforo, potasio, magnesio, calcio y metales pesados por fotometría usando kits comerciales de Merck, cuyos códigos se indican en la tabla 4.

**Tabla 4:** Códigos de cada elemento determinado mediante fotometría.

| <b>Determinación</b> | <b>Código</b> |
|----------------------|---------------|
| <b>Fósforo</b>       | 1.14848.0001  |
| <b>Potasio</b>       | 1.14562.0001  |
| <b>Magnesio</b>      | 1.00815.0001  |
| <b>Calcio</b>        | 1.14815.0001  |
| <b>Plomo</b>         | 1.09717.0001  |
| <b>Cromo</b>         | 1.14758.0001  |
| <b>Cadmio</b>        | 1.01745.0001  |



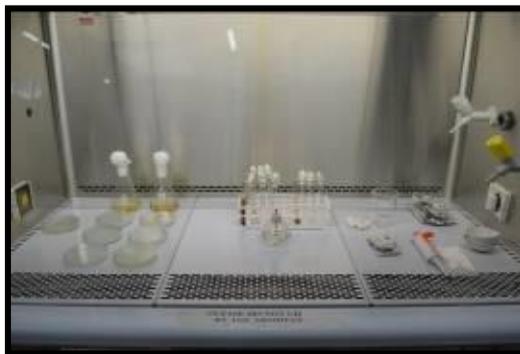
**Figura 5:** Fotografía del procedimiento para determinación de diferentes compuestos químicos del suelo. A) Adición de la solución extractora: cloruro de sodio y bicarbonato de sodio. B) Filtración. C) Kits comerciales Merck. D) Reacción del extracto. E) Comparación de la reacción del extracto. F) Equipo Kjeldahl para determinar Nitrógeno.

### **2.5.3 Determinación de la cantidad de bacterias autóctonas presentes en el suelo contaminado con petróleo.**

Para determinar la cantidad de bacterias autóctonas presentes en el suelo, se tomó 10 gramos de cada muestra, se transfirieron a matraces y se dejó reposar durante 30 minutos, lo que correspondió a la dilución  $10^{-1}$ . En tubos de ensayo se realizó diluciones seriadas hasta obtener  $10^{-10}$ , para ello se trabajó en condiciones estériles usando una cámara de flujo laminar (marca

biomedis®, modelo Infinity ESCO Class II BSC), se incubó durante 30 minutos. Se seleccionaron las diluciones de  $10^{-4}$  a  $10^{-8}$  para la cuantificación de las bacterias (Camacho, y otros, 2009).

Se tomaron 100  $\mu$ L de las muestras diluidas y se inocularon mediante extensión en medios de agar nutritivo previamente preparados; las placas se sometieron en la incubadora (marca MEMMERT, modelo UNB 500) a 37 °C durante 24 horas; para la cuantificación se seleccionaron aquellas placas cuyo crecimiento fue de 30 a 300 colonias (Balba, Al-awadhi, & Al-daher, 1998).



**Figura 6:** Fotografía de la cámara de flujo laminar de clase II.

La cuantificación bacteriana se calculó utilizando la siguiente fórmula expresada en términos de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (Rojas, 2011).

$$\text{UFC/g} = \text{N}^{\circ} \text{ colonias} / \text{Dilución} * \text{Volumen de la muestra}$$

#### 2.5.4 Inoculación de cultivos puros en caldos nutritivos

Se preparó caldo nutritivo, en matraces Erlenmeyer, que fueron esterilizados en un autoclave (marca SHENAN, modelo LDZX – 50FBS) durante 15 minutos y a una temperatura de 121 °C, posteriormente se inocularon los cultivos puros adicionando en cada inoculación 500 µL de petróleo crudo y analizando el matraz control que no contenía el cultivo bacteriano. Finalmente se incubaron a 37 °C durante 7 días, para comprobar la degradación del petróleo (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2008).



**Figura 7:** Fotografía de los caldos nutritivos en matraces Erlenmeyer.

#### 2.5.5 Aislamiento de bacterias degradadoras de petróleo, mediante técnica de enriquecimiento.

Para el aislamiento de bacterias con capacidad biodegradadora se usó un sistema de enriquecimiento, el Medio Mínimo de Sales Minerales (MSM) que contenía macro y micronutrientes: 0,47% de potasio fosfato monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 0,2% hidrógeno fosfato di potásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 4% de Cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), 0,001% de Cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ), 0,02% sulfato

ferroso de amonio II ( $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4$ ), 0,4% de nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) (Wang, Zhang, Li, & Klassen, 2011) .

En el MSM se inoculó el cultivo bacteriano analizado anteriormente y se adicionó el 1 % de petróleo crudo, se homogenizó con un agitador rotatorio (marca Barnstead International, modelo SHKA2000) a 150 rpm, durante 7 días hasta que se observó una turbidez que indicó crecimiento bacteriano, tomando en cuenta un control sin inoculación del cultivo (Wang, Zhang, Li, & Klassen, 2011)



**Figura 8:** Fotografía del agitador rotatorio con matraces Erlenmeyer.

Las colonias puras se transfirieron a placas y tubos inclinados de agar nutriente y se conservaron en solución de glicerol v/v 25% a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  (Arencibia & Rosario, 2003).

### **2.5.6 Análisis de las características morfológicas**

Se preparó suspensiones de los cultivos bacterianos puros, mediante el uso de agua destilada estéril en tubos, se realizó un frotis con una gota de la

suspensión sobre el portaobjetos de vidrio limpio, se fijó con calor y se aplicaron para tinción Gram (Rojas, 2011) como se indica en la tabla 5.

**Tabla 5:** Procedimiento para realizar tinción Gram.

| <b>Solución</b>        | <b>Tiempo</b>       |
|------------------------|---------------------|
| <b>Cristal violeta</b> | Durante 1 minuto    |
| <b>Yodo</b>            | Durante 1 minuto    |
| <b>Alcohol acetona</b> | Durante 20 segundos |
| <b>Safranina</b>       | Durante 1 minuto    |

Después de aplicar cada solución se lavó con agua destilada, finalmente se secó al aire y observó al microscopio (marca MOTIC, modelo B1 advanced series); bajo el objetivo 100x con aceite de inmersión, en la pantalla de un computador bajo el programa Motic Images Plus 2.0, se analizó las características morfológicas tales como forma celular, tamaño y coloración de la tinción Gram (Rojas, 2011).

### **2.5.7 Preparación de stocks de glicerol**

Se mezcló 500 µL del cultivo bacteriano aislado y caracterizado con 500 µL de glicerol estéril al 50 % en Eppendorfs, y se almacenó a -80 °C en un congelador marca BIOBASE, modelo bxc-86hl-538 (Arencibia & Rosario, 2003).

## **2.5.8 Análisis de los efectos de pH, temperatura, concentración y nutrientes sobre biodegradación**

### **2.5.8.1 pH**

Se preparó el medio Mínimo de Sales Minerales (MSM), calibrando los valores de pH en el potenciómetro (marca Thermo Scientific, modelo ORION 3 STAR), a 2, 4, 6, 7.5, 8 y 10; tanto para la cepa 3 como para la cepa 6, se esterilizaron en una autoclave (marca SHENAN, modelo LDZX – 50FBS), a 121°C durante 15 minutos, se adicionó el 1% de petróleo crudo, se inoculó con suspensión bacteriana, e incubó a 37 °C durante 1 semana.

Después del periodo de incubación fue analizada la cantidad de colonias mediante la inoculación en cajas Petri con agar nutritivo, mediante el conteo de Unidades formadoras de colonias, presentes en cada placa (Jorgensen, Pusstien, & Suortti, 2000).

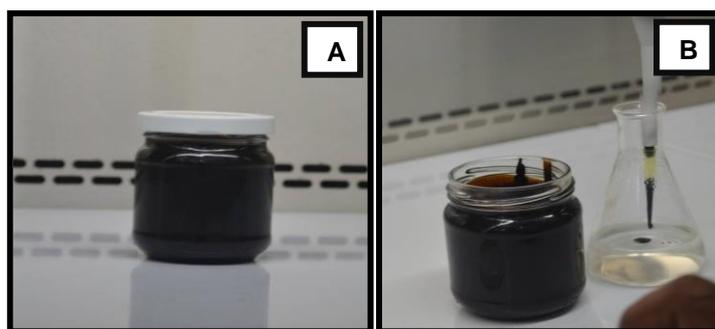
### **2.5.8.2 Temperatura**

El Medio mínimo de sales minerales (MSM), fue calibrado con los valores de pH determinados con anterioridad, esterilizado a 121 °C durante 15 minutos; se adicionó el 1% de petróleo crudo dentro de una cámara de flujo de aire laminar (marca biomedis®, modelo Infinity ESCO Class II BSC), se inoculó la suspensión bacteriana, e incubó a diferentes temperaturas: 8, 25, 37 y 55 °C durante 1 semana. Después de este periodo fueron sembradas en cajas Petri con agar nutritivo para realizar el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) (Jorgensen, Pusstien, & Suortti, 2000).

### 2.5.8.3 Concentración

Se utilizó el Medio Mínimo de Sales Minerales, calibrado con los valores de pH determinados con anterioridad, se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos; se adicionó petróleo crudo a diferentes concentraciones (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 %) tanto para la cepa 3 y 6; e incubó durante 1 semana.

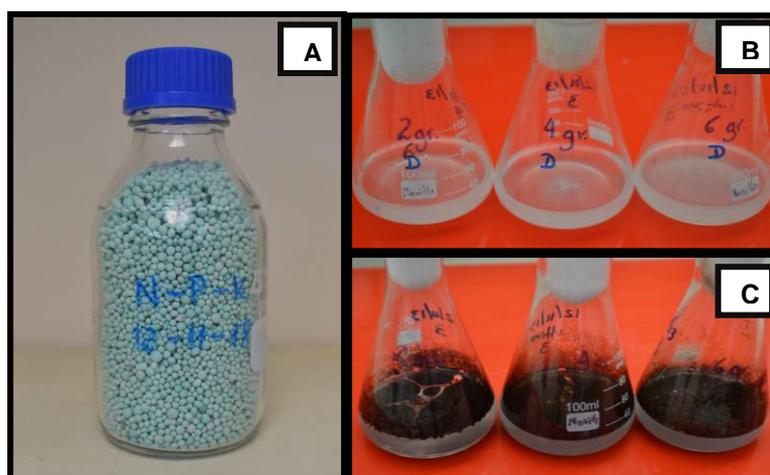
Posteriormente, fueron inoculadas las suspensiones bacterianas, en cajas Petri con agar nutriente y se incubó a 37 °C, durante 24 horas. Finalmente se analizó la cantidad de colonias mediante recuento de UFC (Chaîneau, Yepremian, Vidalie, Ducreux, & Ballerini, 2003).



**Figura 9:** Fotografía. A) Frasco con petróleo crudo. B) Adición de petróleo crudo en los medios de cultivos.

### 2.5.8.4 Nutrientes

El Medio mínimo de sales Minerales (MSM) fue ajustado a pH 6, esterilizado y adicionado nutrientes a concentraciones diferentes (2, 4, 6 g/L) de nitrógeno, fósforo, potasio (NPK), se inoculó la suspensión bacteriana e incubó a 25 y 37 °C durante 1 semana (Margesin & Schinner, 2001).



**Figura 10:** Fotografía de los procedimientos para analizar el efecto de nutrientes. A) Frasco con NPK. B) Medio Mínimo de Sales Minerales con diferentes concentraciones de nutrientes. C) Medios con nutrientes, cultivos y petróleo crudo.

Después del periodo de incubación, se separó el medio inoculado del contaminante, mediante filtrado, usando un embudo. El crecimiento microbiano se analizó mediante turbidimetría, a través de la medida de absorción, para lo cual se homogenizó y tomó 1 mL de solución en una celda de cuarzo, para ser leída en un espectrofotómetro (Thermo Spectronics, modelo Genesys 10UV Scanning) a una longitud de onda de 660 nm (Martínez, Bernal, Agudelo, & Bernier, 2012).



**Figura 11:** Fotografía. A) Separación del petróleo crudo del medio y la suspensión bacteriana. B) Espectrofotómetro.

### **2.5.9 Análisis del crecimiento bacteriano durante el proceso de biodegradación.**

Para el análisis biodegradativo se preparó el medio (MSM) en matraces Erlenmeyer ajustando a pH 6 para la cepa 3 y 6; y pH 7,4 para la asociación de las dos cepas y, fueron esterilizados a 121°C durante 15 minutos (Jorgensen, Pusstien, & Suortti, 2000).

El medio se mezcló con 2 % de petróleo crudo e inoculó las suspensiones bacterianas respectivamente, tomando en cuenta un control, que no contenía cultivo bacteriano; todos los matraces fueron incubados a 37°C durante 18 días (Mohajeri, Abdul, Hasnain, Ali, & Mohajeri, 2010).

Se analizó el crecimiento bacteriano hasta el día 18, mediante la inoculación diaria en cajas Petri con agar nutritivo y el recuento de unidades formadoras de colonias (Chaineau, Yepremian, Vidalie, Ducreux, & Ballerini, 2003).

### **2.5.10 Análisis de la biodegradación de petróleo crudo mediante cromatografía.**

#### **2.5.10.1 Cepa 3 y 6 sin NPK**

El (MSM) fue ajustado a pH 6 y esterilizado a 121 °C durante 15 minutos, se adicionó 2 % de petróleo crudo y se inoculó el cultivo con la cepa 3 o 6 según el caso; los matraces fueron incubados a 25 °C para la cepa 3 y 37 °C para la cepa 6 durante 10 días. Después, se transportaron al laboratorio del Centro de servicios técnicos y transferencia tecnológica ambiental (CESTTA) para la

determinación del porcentaje de degradación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) mediante el uso de cromatografía líquida de alta eficiencia (Chaineau, Yepremian, Vidalie, Ducreux, & Ballerini, 2003).

#### **2.5.10.2 Cepa 3 y 6 con NPK.**

El medio MSM (Mínimo de sales minerales) fue preparado adicionando 6 g/L de NPK para la cepa 3 y 4 g/L para la cepa 6, se ajustó a pH 6 y esterilizó a 121 °C durante 15 minutos, se añadió 2 % de petróleo crudo e inoculó la cepa 3 o 6 , según el caso (Jorgensen, Pusstien, & Suortti, 2000).

Los matraces se incubaron a 25 °C para la cepa 3 y a 37 °C para la cepa 6 durante 40 días y fueron trasladados al laboratorio del Centro de servicios técnicos y transferencia tecnológica ambiental (CESTTA) para la determinación del porcentaje de degradación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) mediante el uso de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (Chaineau, Yepremian, Vidalie, Ducreux, & Ballerini, 2003).

### **2.6 Análisis de Datos**

Los análisis microbiológicos se determinaron a través del conteo de UFC, los resultados fueron interpretados mediante el programa estadístico InfoStat, a través de los análisis de varianza (ANOVA), con pruebas de Tukey para las interacciones entre los factores descritos para el diseño planteado y el análisis de datos en la discusión se sustentó bibliográficamente.

### **2.6.1 Interpretación**

Con el respaldo del análisis estadístico formal, se analizó a detalle lo sucedido en el experimento, ya que durante el proceso se logró verificar supuestos y elegir el tratamiento óptimo; sin embargo, fue importante realizar las repeticiones propuestas para confirmar los resultados (Gutiérrez & De la Vara, 2008).

## CAPÍTULO 3:

### RESULTADOS

#### 3.1 Procesamiento de las muestras

Las muestras fueron secadas bajo sombra, molidas y tamizadas, previas al análisis las propiedades físicas y químicas. La tabla 6 ilustra los resultados de los análisis.

**Tabla 6:** Resultados de los análisis del suelo de la provincia de Sucumbíos.

| Caracter                              | Muestra 1     | Muestra 2     | Muestra 3     |
|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| pH                                    | 7.34          | 5.12          | 6.09          |
| Fósforo                               | 48 mg/kg      | 17 mg/kg      | 45 mg/kg      |
| Potasio                               | 457.48 mg/kg  | 332.98 mg/kg  | 418.48 mg/kg  |
| Magnesio                              | 949.43 mg/kg  | 758.96 mg/kg  | 439.47 mg/kg  |
| Calcio                                | 2999.85 mg/kg | 1349.93 mg/kg | 1979.90 mg/kg |
| Materia orgánica                      | 13.21 %       | 9.74 %        | 2.86 %        |
| Nitrógeno Total                       | 0.21%         | 0.21%         | 0.07%         |
| Plomo                                 | 3.44 mg/L     | 2.36 mg/L     | 1.67 mg/L     |
| Cadmio                                | 0.38 mg/kg    | 15.76 mg/kg   | 16.32 mg/kg   |
| Cromo                                 | 0.08 mg/kg    | 0.08 mg/kg    | 0.2 mg/kg     |
| Capacidad de retención de agua (100%) | 0.416 mL/g    | 0.486 mL/g    | 0.296 mL/g    |

### 3.2 Cantidad de bacterias autóctonas presentes en el suelo contaminado con petróleo.

En los suelos contaminados de petróleo existe actividad bacteriana, y se indica en la tabla 7 la cantidad de UFC/g de cada muestra.

**Tabla 7:** Resultados de la cantidad de UFC, presentes en cada muestra.

| Muestra | UFC /g (Repetición) |                   |                   | Promedio          |
|---------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1       | $6.4 \times 10^6$   | $5.6 \times 10^6$ | $7.2 \times 10^6$ | $6.4 \times 10^6$ |
| 2       | $4.5 \times 10^6$   | $3.8 \times 10^6$ | $5.3 \times 10^6$ | $4.5 \times 10^6$ |
| 3       | $4.0 \times 10^8$   | $3.2 \times 10^8$ | $4.8 \times 10^8$ | $4.0 \times 10^8$ |

### 3.3 Aislamiento de bacterias degradadoras de petróleo

Se aislaron seis cepas bacterianas, identificadas como 1, 2, 3, 4, 5, 6, las que fueron transferidas a placas y tubos picos de flauta de agar de nutriente, y se conservaron en solución de glicerol v/v 25 % a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



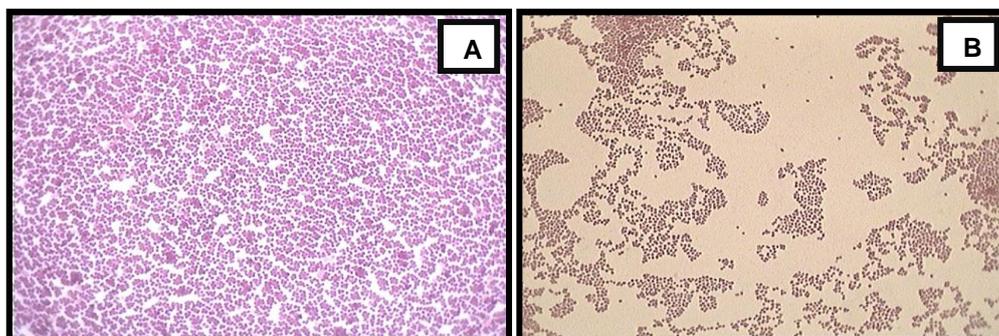
**Figura 12:** Tubos inclinados con las 6 cepas bacterianas aisladas.

### 3.3.1 Características morfológicas

Mediante tinción Gram se caracterizó morfológicamente cada cepa bacteriana, obteniendo los siguientes resultados.

**Tabla 8:** Resultados de la tinción Gram.

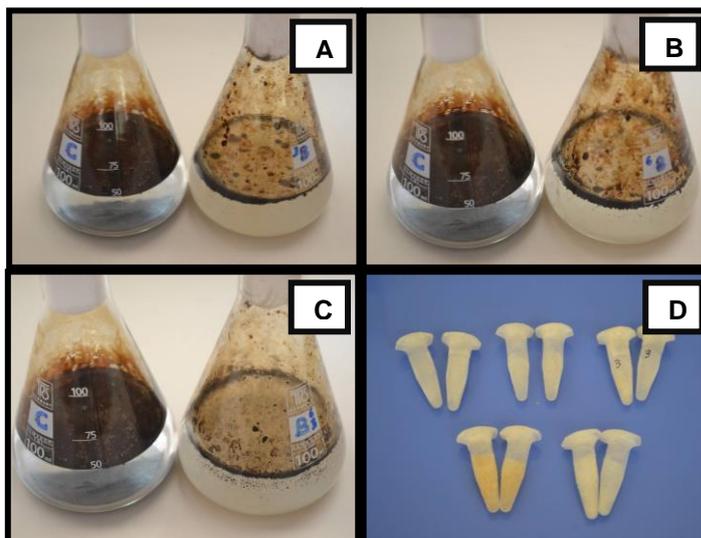
| Cepas | Caracterización  |
|-------|------------------|
| 1     | Bacilos Gram -   |
| 2     | Bacilos Gram -   |
| 3     | Cocos Gram +     |
| 4     | Cocos Gram +     |
| 5     | Bacilos Gram -/+ |
| 6     | Cocos Gram +     |



**Figura 13:** Fotografía de la tinción Gram. A) Cepa 3. B) Cepa 6.

### 3.3.2 Cepas con capacidad biodegradadora

Se demostró que las cepas 3 y 6 tuvieron la capacidad de biodegradar petróleo, las que fueron conservadas en solución de glicerol v/v 25 % a -80 °C.



**Figura 14:** Fotografías de las cepas con capacidad de biodegradar petróleo. A) Control y cultivo 3. B) Control y cultivo 6. C) Control y cultivo 3 y 6. D) Conservación de los cultivos bacterianos.

### 3.4 Evaluación de los efectos de pH, temperatura, concentración del contaminante y nutrientes sobre biodegradación.

Se analizó los diferentes parámetros, cuyos resultados permitieron conservar el rango de pH, temperatura, concentración y nutrientes para tener una biodegradación efectiva.

#### 3.4.1 pH

Se analizó los efectos de la biodegradación con respecto a pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, los mismos que fueron considerados para las dos cepas bacterianas.

Mediante el análisis de varianza realizado en el programa InfoStat se logró determinar la diferencia estadística significativa entre los tratamientos, la tabla 9 contiene el análisis de los efectos de pH sobre la biodegradación.

**Tabla 9:** Análisis de varianza de la evaluación del efecto pH.

| Análisis de varianza                         |      |                |                   |       |         |
|--|------|----------------|-------------------|-------|---------|
| Variable                                     | N    | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |         |
| Ln UFC/g                                     | 36   | 0,98           | 0,98              | 0,88  |         |
| Cuadro de Análisis de Varianza (SC TIPO III) |      |                |                   |       |         |
| F.V.   | SC   | gl             | CM                | F     | P-valor |
| Modelo.                                      | 12,1 | 11             | 1,1               | 127,8 | <0,0001 |
| Cepa   | 0,44 | 1              | 0,44              | 51,01 | <0,0001 |
| pH   | 10,3 | 5              | 2,07              | 240,9 | <0,0001 |
| Cepa*pH                                      | 1,29 | 5              | 0,26              | 30    | <0,0001 |
| Error  | 0,21 | 24             | 0,01              |       |         |
| Total  | 12,3 | 35             |                   |       |         |

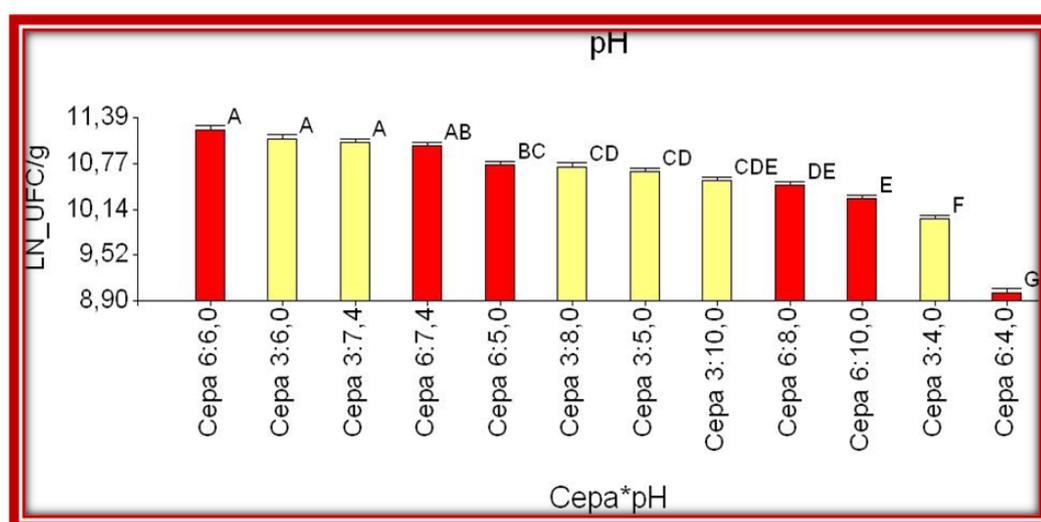
La prueba de comparación de Tukey indica los niveles de significancia, por lo se puede estimar que tratamiento biodegrada mayor cantidad de petróleo crudo a nivel de laboratorio. En la siguiente tabla se muestra la prueba de comparación a diferentes pH.

**Tabla 10:** Prueba de comparación de medias de Tukey del efecto pH.

| Test Tukey Alfa= 0,05 DMS= 27267 |     |        |   |      |       |
|----------------------------------|-----|--------|---|------|-------|
| Error:0,0086 gl: 24              |     |        |   |      |       |
| Cepa                             | pH  | Medias | N | E.E. |       |
| Cepa 6                           | 6   | 11,22  | 3 | 0,05 | A     |
| Cepa 3                           | 6   | 11,1   | 3 | 0,05 | A     |
| Cepa 3                           | 7,4 | 11,05  | 3 | 0,05 | A     |
| Cepa 6                           | 7,4 | 11,01  | 3 | 0,05 | A B   |
| Cepa 6                           | 5   | 10,74  | 3 | 0,05 | B C   |
| Cepa 3                           | 8   | 10,72  | 3 | 0,05 | C D   |
| Cepa 3                           | 5   | 10,65  | 3 | 0,05 | C D   |
| Cepa 3                           | 10  | 10,53  | 3 | 0,05 | C D E |
| Cepa 6                           | 8   | 10,47  | 3 | 0,05 | D E   |
| Cepa 6                           | 10  | 10,29  | 3 | 0,05 | E     |
| Cepa 3                           | 4   | 10,01  | 3 | 0,05 | F     |
| Cepa 6                           | 4   | 9,01   | 3 | 0,05 | G     |

**Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p >0,05)**

Los resultados de la prueba Tukey mostrados en la tabla 10 y figura 15 indicaron que el tratamiento adecuado para la biodegradación de petróleo, se genera a pH 6 y 7,4, ubicándose en los primeros rangos de significancia, por lo que se determinó que no existe diferencia estadística entre estos dos tratamientos a diferencia de los otros, por lo tanto, se puede afirmar que a pH 4, 5, 8 y 10, existió poco crecimiento bacteriano.



**Figura 15:** Evaluación del efecto de pH en la biodegradación de petróleo.

### 3.4.2 Temperatura

Se analizó los efectos de la biodegradación para la cepa 3 y 6 a diferentes temperaturas 8, 25, 37 y 55°C; mediante el análisis de varianza realizado en el programa InfoStat con la determinación de la diferencia estadística altamente significativa entre los tratamientos, la tabla 11 contiene el análisis de varianza de los efectos de temperatura para la biodegradación.

**Tabla 11:** Análisis de varianza de la evaluación del efecto de la temperatura.

| Análisis de varianza                         |      |                |                   |          |          |
|--|------|----------------|-------------------|----------|----------|
| Variable                                     | N    | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV       |          |
| Ln UFC/g                                     | 24   | 0,96           | 0,94              | 1,27     |          |
| Cuadro de Análisis de Varianza (SC TIPO III) |      |                |                   |          |          |
| F.V.   | SC   | gl             | CM                | F        | P-valor  |
| Modelo.                                      | 6,54 | 7              | 0,934341          | 49,97063 | <0,0001  |
| Cepa   | 0,04 | 1              | 0,035975          | 1,924013 | 0,184436 |
| Temperatura                                  | 5,23 | 3              | 1,743601          | 93,25162 | <0,0001  |
| Cepa*Temperatura                             | 1,27 | 3              | 0,424537          | 22,70519 | <0,0001  |
| Error  | 0,3  | 16             | 0,018698          |          |          |
| Total  | 6,84 | 23             |                   |          |          |

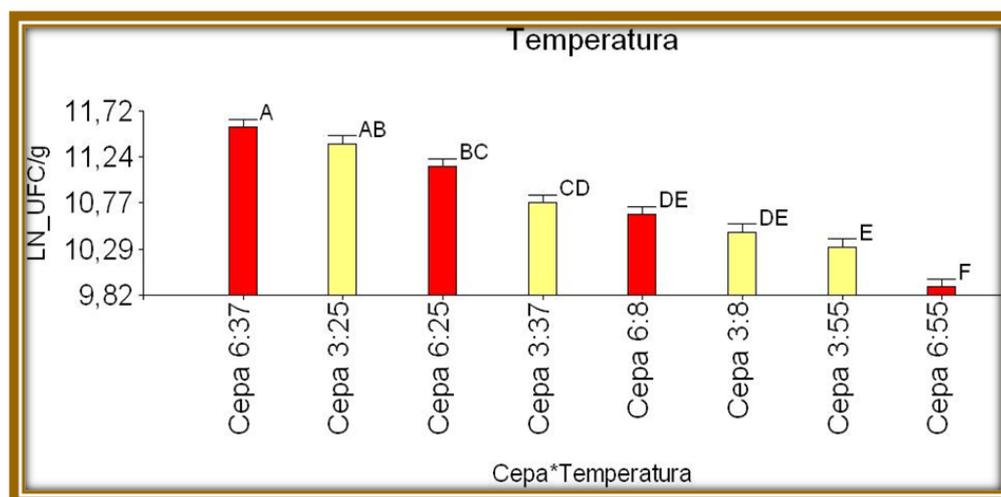
Mediante la prueba de comparación de Tukey se logró determinar que las cepas que se sometieron a una determinada temperatura generan diferencias estadísticas, en la tabla 12 se muestra la prueba.

**Tabla 12:** Prueba de comparación de medias de Tukey del efecto de la temperatura.

| Test Tukey Alfa= 0,05 DMS= 38654  |      |        |   |      |     |
|---|------|--------|---|------|-----|
| Error:0,0187 gl: 16   |      |        |   |      |     |
| Cepa  | T °C | Medias | n | E.E. |     |
| Cepa 6  | 37   | 11,55  | 3 | 0,08 | A   |
| Cepa 3  | 25   | 11,38  | 3 | 0,08 | A B |
| Cepa 6  | 25   | 11,14  | 3 | 0,08 | B C |
| Cepa 3  | 37   | 10,77  | 3 | 0,08 | C D |
| Cepa 6  | 8    | 10,65  | 3 | 0,08 | D E |
| Cepa 3  | 8    | 10,47  | 3 | 0,08 | D E |
| Cepa 3  | 55   | 10,32  | 3 | 0,08 | E   |
| Cepa 6  | 55   | 9,91   | 3 | 0,08 | F   |
| Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p >0,05) |      |        |   |      |     |

Los resultados de la prueba de Tukey mostrados en la tabla 12 y en la figura 16, determinaron que existió una diferencia estadística entre los tratamientos y mostraron que los mejores resultados son a temperatura 37 °C y 25°C para las

cepas 6 y 3 respectivamente, ubicándose en el primer rango de significancia y por lo tanto, se consideraron tratamientos adecuados para la biodegradación de petróleo a nivel de laboratorio.



**Figura 16:** Evaluación del efecto de la temperatura en la biodegradación de petróleo.

### 3.4.3 Concentración del contaminante

En el análisis de la concentración del contaminante se adicionó diferentes concentraciones de petróleo crudo (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 %) tanto para la cepa 3 y 6.

En la tabla 13 se muestra el análisis de varianza de los resultados obtenidos de esta evaluación, los datos demostraron que, estadísticamente no generan diferencias significativas.

**Tabla 13:** Análisis de varianza de la evaluación del efecto de la concentración del contaminante.

| Análisis de varianza |    |                |                   |      |
|----------------------|----|----------------|-------------------|------|
| Variable             | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
| Ln UFC/g             | 30 | 0,89           | 0,84              | 1,64 |

| Cuadro de Análisis de Varianza (SC TIPO III) |      |    |       |        |         |
|--|------|----|-------|--------|---------|
| F.V.   | SC   | gl | CM    | F      | P-valor |
| Modelo.                                      | 5,11 | 9  | 0,567 | 18,416 | <0,0001 |
| Cepa   | 0,19 | 1  | 0,186 | 6,059  | 0,0230  |
| Concentración del contaminante               | 4,83 | 4  | 1,208 | 39,216 | <0,0001 |
| Cepa*Concentración del contaminante          | 0,09 | 4  | 0,021 | 0,705  | 0,5973  |
| Error  | 0,62 | 20 | 0,030 |        |         |
| Total  | 5,72 | 29 |       |        |         |

Estadísticamente no generan diferencias, sin embargo, a una concentración del 2 % existió mayor crecimiento bacteriano en las dos cepas aisladas, además se evidenció un efecto reductor del contaminante a diferencia de los otros tratamientos. Los resultados se observan en la tabla 14.

**Tabla 14:** Promedios para la interacción cepa y concentración del contaminante.

| Cepa   | Concentración | Medias |
|--------|---------------|--------|
| Cepa 6 | 2             | 11,4   |
| Cepa 3 | 2             | 11,22  |
| Cepa 6 | 1,5           | 10,93  |
| Cepa 3 | 1,5           | 10,9   |
| Cepa 6 | 2,5           | 10,77  |
| Cepa 3 | 2,5           | 10,73  |
| Cepa 6 | 1             | 10,67  |
| Cepa 3 | 1             | 10,43  |
| Cepa 6 | 0,5           | 10,24  |
| Cepa 3 | 0,5           | 9,95   |

### 3.4.4 Concentración de nutrientes

Se evaluó la aplicación de nutrientes, nitrógeno, fósforo, potasio (NPK), a concentraciones diferentes (2, 4, 6 g/L), para las dos cepas bacterianas (3 y 6); los resultados fueron analizados a través de la medida de absorción y análisis de varianza que se muestra en la tabla 15.

**Tabla 15:** Análisis de varianza de la evaluación del efecto de nutrientes.

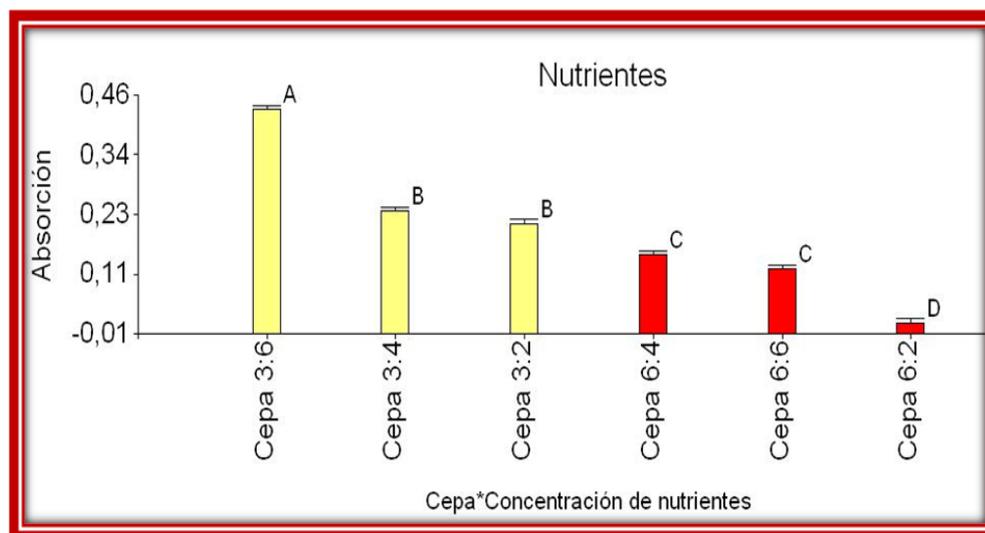
| Análisis de varianza                         |      |                |                   |          |         |
|--|------|----------------|-------------------|----------|---------|
| Variable                                     | N    | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV       |         |
| Absorción                                    | 18   | 0,99           | 0,99              | 6,9      |         |
| Cuadro de Análisis de Varianza (SC TIPO III) |      |                |                   |          |         |
| F.V.   | SC   | gl             | CM                | F        | P-valor |
| Modelo.                                      | 0,3  | 5              | 0,060             | 347,920  | <0,0001 |
| Cepa   | 0,18 | 1              | 0,180             | 1035,619 | <0,0001 |
| Concentración del nutriente                  | 0,08 | 2              | 0,041             | 239,505  | <0,0001 |
| Cepa*Concentración de nutriente              | 0,04 | 2              | 0,019             | 112,485  | <0,0001 |
| Error  | 0    | 12             | 0,00017           |          |         |
| Total  | 0,31 | 17             |                   |          |         |

El análisis de varianza demostró que la evaluación de nutrientes en la biodegradación es altamente significativa, por lo tanto estadísticamente existen diferencias significativas para la fuente de variabilidad.

**Tabla 16:** Prueba de comparación de medias de Tukey para el efecto de la concentración de nutrientes.

| Test Tukey Alfa= 0,05 DMS= 0,03622  |               |        |   |      |   |  |
|---|---------------|--------|---|------|---|--|
| Error:0,0002 gl: 12   |               |        |   |      |   |  |
| Cepa  | Concentración | Medias | n | E.E. |   |  |
| Cepa 3  | 6             | 0,43   | 3 | 0,01 | A |  |
| Cepa 3  | 4             | 0,23   | 3 | 0,01 | B |  |
| Cepa 3  | 2             | 0,21   | 3 | 0,01 | B |  |
| Cepa 6  | 4             | 0,15   | 3 | 0,01 | C |  |
| Cepa 6  | 6             | 0,12   | 3 | 0,01 | C |  |
| Cepa 6  | 2             | 0,01   | 3 | 0,01 | D |  |
| Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p >0,05) |               |        |   |      |   |  |

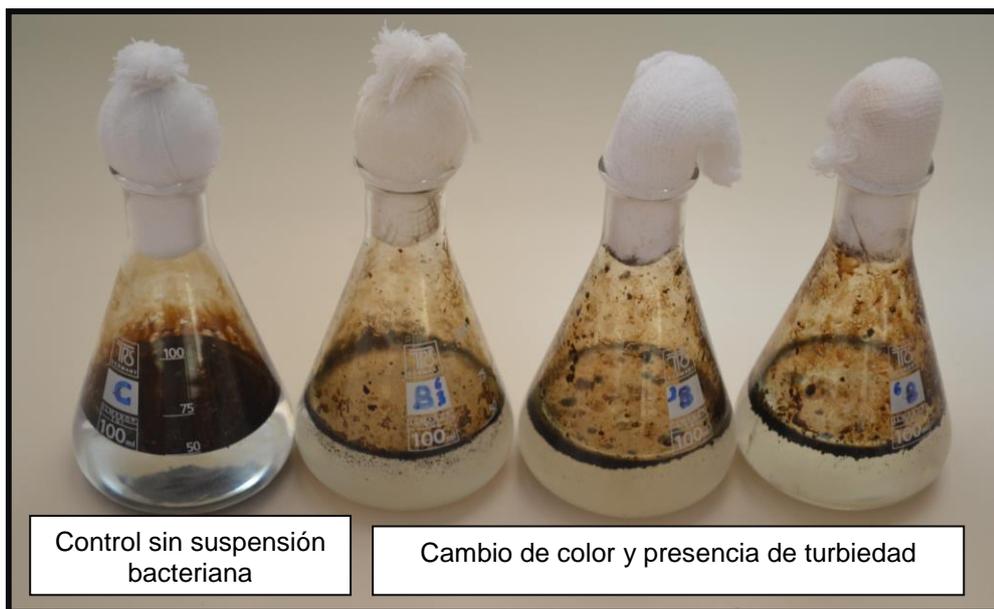
La prueba de comparación de Tukey mostrada en la tabla 16 y figura 17 indicaron los rangos de significancia, por lo tanto consideró tratamientos adecuados para la biodegradación de petróleo a nivel de laboratorio, las concentraciones 6 g/L para la cepa 3 y 4 g/L para la cepa 6.



**Figura 17:** Evaluación del efecto de la concentración del contaminante en la biodegradación de petróleo.

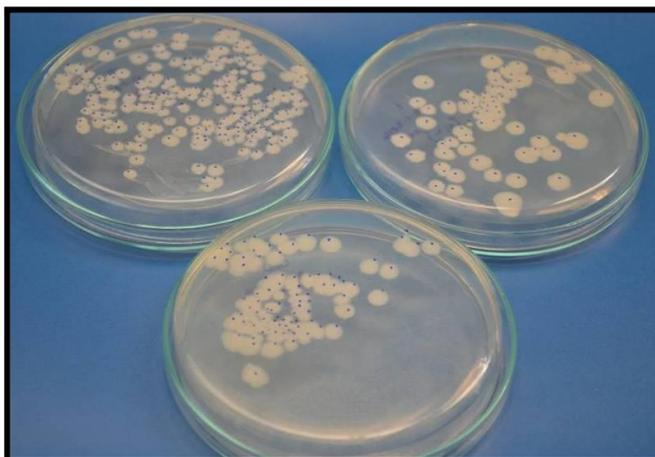
### 3.5 Crecimiento bacteriano durante el proceso de biodegradación.

El medio mínimo de sales minerales (MSM) fue mezclado con 2 % de petróleo crudo y se inoculó las suspensiones bacterianas respectivamente, en la figura 18 se observó el crecimiento bacteriano; que fue evidenciado a través de la coloración blanca y turbidez; además las cepas asimilaron el petróleo como única fuente de carbono, demostrado mediante la reducción de la capa de petróleo; a diferencia del control, que no tenía suspensión bacteriana, donde no existió cambio alguno.



**Figura 18:** Fotografía del control y de los medios de cultivos con suspensión bacteriana durante la biodegradación de petróleo crudo.

Mediante la inoculación de cada cepa bacteriana, en medios de agar nutritivo, se realizó el conteo diario de unidades formadoras de colonias (UFC), ilustrada en la figura 19.



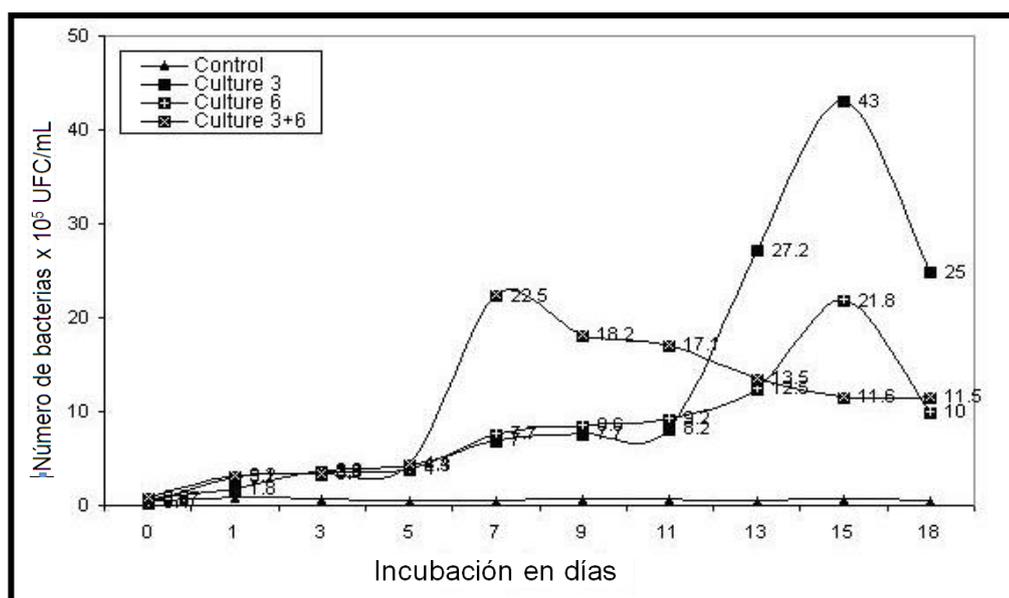
**Figura 19:** Fotografía del conteo diario de unidades formadoras de colonias.

En la figura 20 correspondiente a la curva de crecimiento bacteriano se observó que la cepa 3 mantuvo un crecimiento latente hasta el día 11, a partir del cual empezó la fase exponencial, al día 15 mostró un crecimiento máximo, y un decrecimiento a partir del día 16.

La cepa 6 estableció una fase de adaptación hasta el día 11, un crecimiento paulatino durante la fase exponencial, llegando al crecimiento máximo en el día 15 y finalmente a una fase de muerte a partir del día 16.

Las cepas 3 y 6 juntas, mostraron un crecimiento rápido; la figura 20 indicó que hasta el día 5 permanecieron en fase de latencia, a partir del cual empezó la fase exponencial, demostrando un máximo desarrollo al séptimo día y al octavo se observó un decrecimiento lento.

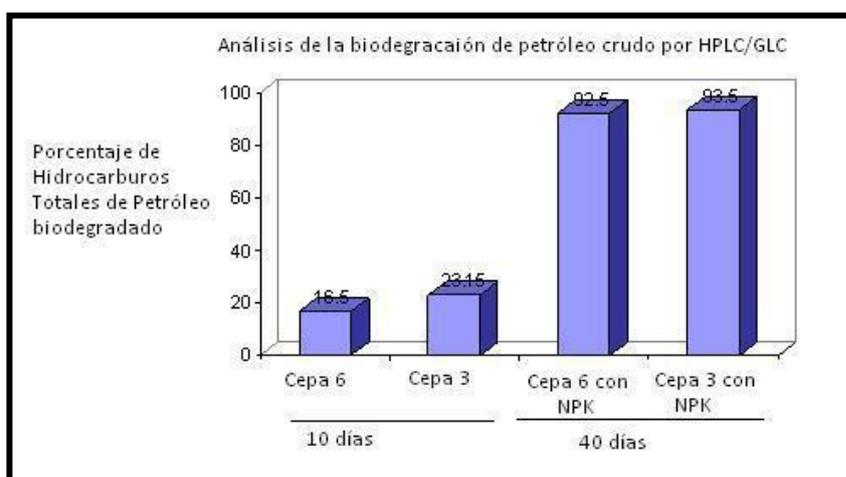
### Curva de crecimiento de bacterias con petróleo crudo



**Figura 20:** Curva de crecimiento de las cepas bacterianas analizadas en el proceso de biodegradación.

### 3.6 Resultados de la degradación del petróleo crudo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La figura 21, demostró que sin adicionar nutrientes en un periodo de 10 días las cepas bacterianas 6 y 3 biodegradan solo el 16.5 % y 23.15 % respectivamente pero, su eficiencia se indicó mediante la adición de nutrientes, ya que, la cepa 3 en un periodo de incubación de 40 días biodegrada el 93.5 % de petróleo crudo, tomando en cuenta los tratamientos adecuados de pH, temperatura, concentración de petróleo y nutrientes, analizados con anterioridad, por otra parte se determinó que ajustando los mismos tratamientos la cepa 6, biodegrada el 92.5 % de petróleo después de 40 días.



**Figura 21:** Análisis del porcentaje de biodegradación de petróleo crudo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia.

## **CAPÍTULO 4:**

### **DISCUSIÓN**

El análisis de las muestras de suelo constituyó uno de los principales procesos previos para una investigación, porque, permitieron determinar las condiciones previas, que se debieron considerar para el estudio de la biodegradación de petróleo, en función de la biodiversidad bacteriana existente.

Zagal & Sadzawka, (2007) demostraron que utilizar la técnica de secado bajo sombra del suelo contaminado, permite conservar el contenido de humedad óptimo para manejarlo y procesarlo; la masa de suelo permaneció relativamente constante, logrando conservar los microorganismos a través del almacenaje a temperatura de 4 °C.

Dentro de los análisis físicos y químicos se analizó el pH de las muestras de suelos; según Perry (2003), es un factor importante que controla los procesos químicos.

En las muestras analizadas existieron variaciones de pH, obteniendo resultados de 7,34, 5 y 6 para la primera, segunda y tercera muestra respectivamente. Estos datos corresponden a las variaciones de las características de los suelos, siendo común un rango de pH 5-7 en regiones

húmedas de la Amazonía, donde frecuentemente se presentan lluvias (Navarro & Navarro, 2003).

Los análisis de macro nutrientes de suelo, fósforo, potasio, magnesio y calcio, se realizaron para analizar su disponibilidad, y se dedujo que en las tres muestras existieron altos valores de calcio. Manahan (2007) certifica que estos resultados, dependen de la reserva de nutrimentos presentes, a diferencia de la disponibilidad de nitrógeno, potasio y fósforo que son los más deficientes, por lo que en la mayoría de suelos se suelen adicionar fertilizantes.

El porcentaje de materia orgánica disminuyó paulatinamente en la muestra 1, 2 y 3; lo que corresponde a la baja cantidad de restos vegetales y a la presencia de petróleo, ya que, está constituido por compuestos orgánicos (Martínez & López, 2001).

La mayor parte de metales liberados al ambiente son retenidos en el suelo, sin embargo, las tres muestras indicaron valores bajos, pudo deberse a que los sectores donde se tomaron las muestras, no presentaron actividad industrial ni minera o pueden encontrarse en forma natural, siendo una ventaja para la actividad de las bacterias en el suelo (Volke, Velasco, & De la Rosa, 2005).

La cantidad de bacterias autóctonas presentes en las muestras 1, 2 y 3 fueron de  $6.4 \times 10^6$ ,  $4.5 \times 10^6$ ,  $4.0 \times 10^6$  UFC/g respectivamente; según Vargas, Cuéllar & Dussán (2004), en suelos contaminados con petróleo existen de  $10^4$  a  $10^6$  células por gramo de suelo, por lo tanto existe mayor contenido de bacterias a diferencia de suelos no contaminados.

El éxito de la biodegradación de petróleo a nivel de laboratorio dependió de la disponibilidad de bacterias, se obtuvieron seis aislados, pero solo dos cepas presentaron turbidez y efecto reductor de la capa de contaminante, las que usaron el petróleo como fuente de carbono y energía para realizar sus procesos metabólicos y sobrevivir, favoreciendo a la biodegradación (Acuña, Pucci, Morales, & Pucci, 2010).

Las características morfológicas demostraron que las cepas biodegradadoras de petróleo fueron cocos Gram positivos (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2008).

Ganesh & Lin, (2009) demostraron que las bacterias Gram positivas como *Rhodococcus* y *Bacillus* sp. tienen la capacidad de biotransformación y biodegradación de compuestos orgánicos.

El análisis de los efectos de la temperatura, pH, concentración del contaminante y nutrientes, sirvió para evaluar los factores durante el proceso de biodegradación (Pardo, Perdomo, & Benavides, 2004).

Estadísticamente el comportamiento de las cepas bacterianas fue mejor a pH 6, siendo favorable para el proceso de biodegradación y por ende para el crecimiento de las bacterias (Solanas, 2009).

Las cepas aisladas presentaron un óptimo crecimiento a temperaturas 25 y 37 °C, Frioni (2011) afirma que son bacterias mesófilas ya que, presentaron un rango de crecimiento de 15 a 45°C, estas temperaturas se conservaron durante la investigación, para tener un desarrollo bacteriano satisfactorio.

Se comprobó que las bacterias biodegradan eficazmente el petróleo a una concentración del 2%, evidenciado a través de la reducción de la capa de petróleo que usaron como fuente de carbono, sin embargo, también requirieron nutrientes con la finalidad de estimular su crecimiento (Pardo, Perdomo, & Benavides, 2004).

Estadísticamente se determinó que las concentraciones necesarias para biodegradar petróleo fueron 6 g/L para la cepa 3 y 4 g/L para la 6, según Pardo, Perdomo, & Benavides, (2004) aceleran el proceso de biodegradación, porque, les brindan energía para que realicen sus procesos metabólicos.

Las bacterias cumplieron su función cuando estuvieron presentes en óptimas condiciones (Pardo, Perdomo, & Benavides, 2004).

En cuanto al comportamiento de las cepas durante el crecimiento en el proceso de biodegradación se estableció que la asociación de bacterias resultó mejor, ya que, su crecimiento fue más rápido, lo que se afirmó mediante la curva de crecimiento, donde presentaron mayor efectividad en biodegradar petróleo, según Cardona & Iturbe (2003) es por la combinación de sus actividades metabólicas beneficiándose ambas de la fuente de energía y generando mayor crecimiento de la población bacteriana y por lo tanto, mayor biodegradación.

Se comprobó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia, que la cepa 3 degrada el 93.5 %, y la 6 el 92.5 % de HTP (Hidrocarburos totales de petróleo) lo que corresponde a la eficiencia del máximo consumo de petróleo ejercida por las bacterias durante 40 días de incubación (Mehrasbi, Haghghi, Shariat, Naseri, & Naddaf, 2003).

## **CAPÍTULO 5:**

### **CONCLUSIONES**

1. Los suelos contaminados con petróleo del cantón Lago Agrio, presentaron un promedio de  $5 \times 10^6$  UFC/g de bacterias autóctonas, de las cuales, la cepa 3 y 6 tuvieron la capacidad de biodegradar petróleo, siendo identificadas como cocos Gram positivos.
2. Las bacterias presentaron una degradación de petróleo óptima a pH 6. y crecimiento a temperaturas de 25 y 37 °C.
3. El efecto de reducción de la capa de petróleo en las unidades experimentales se consideró mayor cuando se adicionó el 2% de petróleo, pues las bacterias lo usaron como única fuente de carbono.
4. Existió mayor crecimiento bacteriano en el proceso de biodegradación, a concentraciones de 6 g/L y 4 g/L de nitrógeno, fósforo y potasio.
5. El crecimiento bacteriano jugó un rol importante y eficaz en el proceso de biodegradación, ya que, mientras más crecimiento bacteriano existió en el medio, mayor fue la biodegradación de petróleo.
6. Mediante cromatografía de gases se demostró que las cepas 3 y 6 tuvieron la capacidad de biodegradar el 93.5 y 92.5 % respectivamente de hidrocarburos totales durante un periodo de incubación de 40 días, tomando en cuenta los tratamientos óptimos para su biodegradabilidad.

## **CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES**

Asociar las dos cepas bacterianas para tener un rápido crecimiento y mayor capacidad de biodegradar petróleo crudo.

Realizar un estudio minucioso mediante la identificación bacteriana por secuenciación molecular, con la finalidad de conocer con certeza la especie bacteriana que tiene la ventaja de biodegradar petróleo.

Ejecutar un estudio bioquímico y enzimático para determinar específicamente la participación de las enzimas que actúan en la biodegradación de petróleo, estableciendo estrategias de biorremediación ambiental y aplicación biotecnológica.

Desarrollar investigaciones en suelos contaminados de petróleo usando las cepas bacterianas aisladas en esta investigación para efectuar y evaluar un proceso de biorremediación.

## CAPÍTULO 7:

### BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, A., Pucci, G., Morales, M., & Pucci, O. (2010). *Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de*. Recuperado el 2014 de Marzo de 2014, de <http://www.scielo.org.ve/pdf/rsvm/v30n1/art07.pdf>
- Arencibia, D., & Rosario, L. (2003). *Métodos de conservación de cepas de Salmonella typhimurium utilizadas en el ensayo de Ames*. Recuperado el 21 de Agosto de 2013, de [http://www.sertox.com.ar/img/item\\_full/19002.pdf](http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19002.pdf).
- Atlas, R., & Bartha, R. (2002). *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. España: Editorial Adisson Wesley.
- Baker, C., Caisse, C., & Johnson, B. (2009). *Oil Pollution in Ecuador. A Devised Remediation Approach*. Recuperado el 3 de Julio de 2013, de <http://www.wpi.edu/Pubs/E-project/Available/E-project-122209-135034/unrestricted/OilRemediationFinalReport.pdf>.

- Balba, M., Al-awadhi, N., & Al-daher, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of microbiological methods*, 32(2), 155-164.
- Bannert, M., Berger, W., Fischer, H., Horchler, D., Keese, K., Lehnik, P., . . . Win, T. (2001). *Exigencias para la toma de muestras, el manejo de muestras y los métodos químicos de investigación y análisis para propiedades federales (EPTMyMIA)*. Recuperado el 13 de Agosto de 2013, de <http://www.semarnat.gob.mx/archivosanteriores/temas/gestionambiental/Materiales%20y%20Actividades%20Riesgosas/sitioscontaminados/GTZ/M-Exigencias%20a%20la%20toma%20de%20muestras%20de%20suelos-SRA.pdf>
- Bravo, E. (Mayo de 2007). *Los impactos de la explotación petrolera en ecosistemas tropicales y la biodiversidad*. Recuperado el 2013 de Septiembre de 2013, de [http://www.inredh.org/archivos/documentos\\_ambiental/impactos\\_explotacion\\_petrolera\\_esp.pdf](http://www.inredh.org/archivos/documentos_ambiental/impactos_explotacion_petrolera_esp.pdf)
- Bustamante, A., & Jarrín, M. (2004). *Impactos sociales de la actividad petrolera: Un análisis de los indicadores*. Recuperado el 20 de Septiembre de 2013, de <http://biblioteca.clacso.edu.ar/ar/libros/ecuador/flacso/artbus.pdf>.

- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B., & Velásquez, O. (2009). *Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico*. Recuperado el 30 de Octubre de 2013, de [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasic-Diluciones\\_6526.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasic-Diluciones_6526.pdf)
- Camino, E. (2003). *Informe de Perito de la inspección Judicial en el pozo Sacha 10*. Recuperado el 1 de Julio de 2013, de <http://chevrontoxico.com/assets/docs/sa-10-informe-a-corte.pdf>
- Cando, M. (2011). *Determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*. Recuperado el 2 de Julio de 2013, de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1520/11/UPS-CT002143.pdf>.
- Cardona, S., & Iturbe, R. (2003). Biodegradación de diesel mexicano por un consorcio de bacterias de un suelo agrícola. *Redalyc*, 70(138), 13-25.
- Carrera, L. (2008). *Manual de procedimientos contables en los contratos de la actividad petrolera y su incidencia tributaria*. Recuperado el 9 de Octubre de 2013, de <http://repositorio.uasb.edu.ec/bitstream/10644/3017/1/T1092-MT-Carrera-Manual.pdf>.
- Castro, G. (2007). *Diseño monitoreo frente derrames de hidrocarburos*. Recuperado el 17 de Octubre de 2013, de

[http://www.sag.cl/sites/default/files/INFORME\\_FINAL\\_ASESORIA\\_SAG\\_HCS2.pdf](http://www.sag.cl/sites/default/files/INFORME_FINAL_ASESORIA_SAG_HCS2.pdf).

Castro, P. (2007). *Equipos, instalaciones y procedimientos exigidos a bordo para la disminución de la contaminación y los efectos de esta sobre el medio ambiente*. Recuperado el 9 de Septiembre de 2013, de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/bmfcic355e/doc/bmfcic355e.pdf>.

Chaineau, C., Yepremian, C., Vidalie, J., Ducreux, J., & Ballerini, D. (2003). Bioremediation of a crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessments. *Water, air and soil pollution*, 144(1-4), 419-440.

Coria, I. (Agosto de 2007). *Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. Recuperado el 1 de Julio de 2013, de <http://www.sustentabilidad.uai.edu.ar/pdf/ing/uais-iga-600-001%20-%20remediacion.pdf>

Delgado, J. (2006). *Asfaltenos, composición, agregación, precipitación*. Recuperado el 18 de Septiembre de 2013, de <http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S369A.pdf>.

Di, M., & Vicién, C. (2010). *Biorremediación: Vinculaciones entre investigación, desarrollo y legislación*. Recuperado el 3 de Julio de 2013, de <http://www.ceur-conicet.gov.ar/imagenes/biorremediacion.pdf>.

Echeverri, G., Manjarrez, G., & Cabrera, M. (2010). *Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas*

*costeros en la bahía de Cartagena*. Recuperado el 4 de Julio de 2013, de [http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/NOVA13\\_ARTORIG7.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA13_ARTORIG7.pdf).

Fernández, C., Silva, M., Pereira, J., Mallia, A., Llobregat, M., & Altamore, V. (2006). *Biodegradabilidad de las fracciones de resinas y asfaltenos por pseudomonas en suelo impactado con crudo mediano*. Recuperado el 8 de Septiembre de 2013, de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=70713202>.

Frioni, L. (1999). *Procesos Microbianos*. Recuperado el 4 de Octubre de 2013, de <http://www.fagro.edu.uy/~microbiologia/Procesos%20Microbianos.pdf>.

Frioni, L. (2011). *Microbiología: básica, ambiental y agrícola*. (Segunda edición ed.). Argentina.

Ganesh, A., & Lin, L. (2009). Diesel degradation and biosurfactant production by Gram-positive isolates. *African Journal of Biotechnology*, 8(21), 5847-5854.

Guerrero, R., & Berlanga, M. (2006). *Movimiento procariótico: entre la atracción y la repulsión en los balbuseos de la vida*. Recuperado el 24 de Octubre de 2013, de [http://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/SEM40\\_18.pdf](http://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/SEM40_18.pdf).

Gutiérrez, H., & De la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. México: Editorial Mc Graw-Hill.

Herreo, Y., Toledo, M., Mediavilla, M., Orozco, A., Prieto, P., Church, N., . . . Guillamón, A. (2012). *No dejes el futuro en sus manos*. Recuperado el 11 de Octubre de 2013, de [http://www.cultopias.org/IMG/pdf/0\\_-\\_alex\\_guillamon.pdf](http://www.cultopias.org/IMG/pdf/0_-_alex_guillamon.pdf).

Jacott, M., Arias, J., Guzmán, H., & Franco, A. (2011). *Impactos de la actividad petrolera y en la salud humana y el ambiente*. Recuperado el 11 de Septiembre de 2013, de [http://www.mexicotoxico.org.mx/sites/default/files/pdf/documentos/impacto\\_del\\_petroleo.pdf](http://www.mexicotoxico.org.mx/sites/default/files/pdf/documentos/impacto_del_petroleo.pdf).

Jorgensen, K., Pusstien, J., & Suortti, A. (2000). Biorremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil by composting in biopiles. *Environment pollution*, 107(2), 245-254.

Juárez, M., Sánchez, J., & Sánchez, A. (2006). *Química del suelo y medio ambiente*. España: Editorial Universidad de Alicante .

Labrador, J. (2006). *Manejo del suelo en los sistemas agrícolas de producción ecológica*. Recuperado el 24 de Septiembre de 2013, de <http://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/manuales-tecnicos/manual-suelos-jlabrador.pdf>

- Larrea, C. (2010). *Petróleo o conservación en el Parque Yasuní: una opción histórica*. Recuperado el 10 de Octubre de 2013, de [http://www.campusvirtual.uasb.edu.ec/uisa/images/publicaciones/2010\\_Larrea\\_yasuni.pdf](http://www.campusvirtual.uasb.edu.ec/uisa/images/publicaciones/2010_Larrea_yasuni.pdf)
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., & Clark, D. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos*. (Duodécima edición ed.). España: Editorial Adisson Wesley.
- Manahan, S. (2007). *Introducción a la Química Ambiental*. México: Editorial Reverté S.A.
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Bioremediation (natural attenuation and bioestimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3127-3133.
- Marín, M. (2003). *Análisis químico de suelos y aguas, transparencia y problemas*. Valencia: Editorial Universidad Politécnica de Valencia.
- Martínez, P., Bernal, J., Agudelo, E., & Bernier, S. (2012). *Tolerancia y degradación del glifosato por bacterias aisladas de suelos con aplicaciones frecuentes de Roundup SL®*. Recuperado el 5 de Noviembre de 2013, de [http://www.revistapilquen.com.ar/Agronomia/Agro12/12\\_Martinez%20y%20otros\\_Tolerancia.pdf](http://www.revistapilquen.com.ar/Agronomia/Agro12/12_Martinez%20y%20otros_Tolerancia.pdf).

- Martínez, V., & López, F. (2001). Efectos de los hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de un suelo arcilloso. *Terra*, 19(1), 9-17.
- Mehrasbi, M., Haghghi, B., Shariat, M., Naseri, S., & Naddaf, K. (2003). *Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Soil*. Recuperado el 21 de Marzo de 2014, de [http://journals.tums.ac.ir/upload\\_files/pdf/\\_/267.pdf](http://journals.tums.ac.ir/upload_files/pdf/_/267.pdf).
- Mitja, A., Escobar, J., Reol, N., Castells, C., Marti, X., Larruy, Y., & Chiva, P. (2002). *El petróleo, el recorrido de la energía*. Recuperado el 5 de Julio de 2013, de <http://www.fenercom.com/pdf/aula/recorrido-de-la-energia-el-petroleo.pdf>.
- Mohajeri, L., Abdul, H., Hasnain, M., Ali, M., & Mohajeri, S. (2010). Ex situ Bioremediation of crude oil in soil, a comparative kinetic analysis. *Springer Science*, 85, 54-58.
- Montaño, N., Sandoval, A., Camargo, S., & Sánchez, J. (2010). *Los microorganismos:pequeños gigantes*. Recuperado el 4 de Octubre de 2013, de <http://www.elementos.buap.mx/num77/pdf/15.pdf>
- Mrozik, A., Piotrowska, Z., & Labuzek, S. (2002). *Bacterial Degradation and Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hidrocarbons*. Recuperado el 2 de Julio de 2013, de <http://www.pjoes.com/pdf/12.1/15-25.pdf>.
- Narváez, I. (2009). *El petróleo en el Ecuador*. Recuperado el 8 de Octubre de 2013, de

[http://www.flacsoandes.org/web/imagesFTP/9301.WP\\_014\\_Narvaez\\_02.pdf](http://www.flacsoandes.org/web/imagesFTP/9301.WP_014_Narvaez_02.pdf).

Navarro, L., Álvarez, M., Grosso, J., & Navarro, U. (2004). *Separación y caracterización de resinas y asfaltenos provenientes del crudo castilla. Evaluación de su interacción molecular*. Recuperado el 19 de Septiembre de 2013, de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-53832004000100003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-53832004000100003&script=sci_arttext).

Navarro, S., & Navarro, G. (2003). *Química Agrícola*. España: Editorial Mundi Prensa.

Nogales, B. (2005). *La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg*. Recuperado el 3 de Octubre de 2013, de [http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/7918/1/ECO\\_14\(2\)\\_06.pdf](http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/7918/1/ECO_14(2)_06.pdf).

Ñutez, D. (2012). *Biorremediación para la degradación de Hidrocarburos Totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible*. Recuperado el 3 de Julio de 2013, de <http://recursosbiblioteca.utp.edu.co/tesisd/textoyanexos/6281683N975.pdf>.

Orellana, J. (2005). *Contaminación*. Recuperado el 1 de Julio de 2013, de [http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/civil/ing\\_sanitaria/Ingenieria\\_Sanitaria\\_A4\\_Capitulo\\_02\\_Contaminacion.pdf](http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/civil/ing_sanitaria/Ingenieria_Sanitaria_A4_Capitulo_02_Contaminacion.pdf).

- Ortiz, E., Nuñez, R., Fonseca, E., Oramas, J., Almazan, V., Cabranes, . . . G, B. (2005). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. (C. d. Habana, Ed.) Recuperado el 2 de Julio de 2013, de <http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/revistas/archives/HASH177d/05f7ddb4.dir/doc.pdf>
- Ortíz, J., Salvador, J., Vásquez, A., & Delgado, J. (2009). Recuperado el 20 de Septiembre de 2013, de <http://www.olade.org/sites/default/files/seminarios/Eliminaci%C3%B3n%20del%20mayor%20impacto%20ambiental%20de%20la%20Selva%20Puruana.pdf>.
- Pardo, J., Perdomo, M., & Benavides, J. (2004). *Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo*. Recuperado el 20 de Marzo de 2014, de [http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA\\_12/artorig4\\_2.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA_12/artorig4_2.pdf)
- Perry, L. (2003). *pH for the garden*. Recuperado el 6 de Marzo de 2014, de <http://pss.uvm.edu/ppp/pubs/oh34.htm>
- Pineda, G., Boll, G., & Mesta, A. (2002). *Biodegradación de asfaltenos por un consorcio microbiano aislado de petróleo crudo "Maya"*. Recuperado el 18 de Septiembre de 2013, de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37018202>

Primo, E. (1999). *Química Orgánica, básica y aplicada. De la molécula a la industria*. Barcelona: Editorial Reverté S.A.

Ramseur, J. (2012). *Oil spills in U.S. Coastal water: Background and Governance*. Recuperado el 2 de Septiembre de 2013, de <http://www.fas.org/sgp/crs/misc/RL33705.pdf>.

Rojas, A. (2011). *Conceptos y prácticas de Microbiología General*. Recuperado el 4 de Noviembre de 2013, de <http://www.bdigital.unal.edu.co/4999/1/albertorojastrivino.2011.pdf>.

Romero, A. (2010). *Contaminación ambiental y calentamiento global*. México: Editorial Trillas.

Rourke, D. (2010). *Estimate of the number and costs of excess cancer deaths associated with residence in the oil producing areas of Sucumbios Orellana provinces of Ecuador*. Recuperado el 10 de Septiembre de 2013, de <http://chevrontoxico.com/assets/docs/20100917-appendices/annex-d-estimation-of-excess-cancer-deaths.pdf>.

Sebastian, J., Armstrong, B., Córdova, J., & Stephens, C. (2005). *Exposures and cancer incidence near oil fields in the Amazon Basin of Ecuador*. Obtenido de <http://chevrontoxico.com/assets/docs/oem01.pdf>.

Silos, J. (2008). *Manual de lucha contra la contaminación por hidrocarburos*. (U. d. Cádiz, Ed.) España: Primera Edición.

- Solanas, A. (2009). *LA biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos*. Recuperado el 28 de Octubre de 2013, de <http://congress.cimne.com/zns09/admin/files/filepaper/p422.pdf>
- Torres, K., & Zuluaga, T. (2009). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*. (U. d. Medellín, Ed.) Recuperado el 2 de Julio de 2013, de [http://www.bdigital.unal.edu.co/815/1/32242005\\_2009.pdf](http://www.bdigital.unal.edu.co/815/1/32242005_2009.pdf).
- Universo. (2013). *El gobierno pone fin a la iniciativa Yasuní ITT y avala su explotación*. Recuperado el 11 de Octubre de 2013, de <http://www.eluniverso.com/noticias/2013/08/16/nota/1295016/gobierno-pone-fin-iniciativa-yasuni-itt-avala-su-explotacion>.
- Vallejo, V., Salgado, L., & Roldan, F. (2005). *Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs contaminados con petróleo*. Recuperado el 15 de Julio de 2013, de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/viewFile/501/898>.
- Vargas, P., Cuéllar, R., & Dussán, J. (2004). *Biorremediación de residuos de petróleo*. Recuperado el 12 de Marzo de 2014, de <http://hipotesis.uniandes.edu.co/hipotesis/images/stories/ed04pdf/Biorremediacion.pdf>
- Vogliano, S. (2009). *Ecuador-Extracción petrolera en la Amazonía*. Recuperado el 12 de Marzo de 2014, de

[http://www.fuhem.es/media/ecosocial/image/culturambiente/fichas/ECUA\\_DOR\\_combustibles\\_n22.pdf](http://www.fuhem.es/media/ecosocial/image/culturambiente/fichas/ECUA_DOR_combustibles_n22.pdf).

- Volke, T., Velasco, J., & De la Rosa, D. (2005). *Suelos contaminados por metales pesados y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación*. México.
- Wang, Q., Zhang, S., Li, Y., & Klassen, W. (2011). Potential approaches to improving biodegradation of hydrocarbons for bioremediation of crude oil pollution. *Journal of Environmental Protection*, 47-55.
- Willey, J., Sherwood, L., & Woolverton, C. (2008). *Microbiología de Prescott, Harley y Klein* (Sétima edición. ed.). España: Editorial Mac Graw-Hill-Interamericana.
- Zagal, E., & Sadzawka, A. (2007). *Protocolo de métodos de análisis para suelos y lodos*. Recuperado el 5 de Marzo de 2014, de [http://www.sag.cl/sites/default/files/METODOS\\_LODOS\\_SUELOS.pdf](http://www.sag.cl/sites/default/files/METODOS_LODOS_SUELOS.pdf)
- Zamora, A., Ramos, J., & Arias, M. (2012). *Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades Químicas y Microbiológicas de un suelo de Sabana*. Recuperado el 2 de Julio de 2013, de <http://www.scielo.org.ve/pdf/ba/v24n1/art02.pdf>.