

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO ÓPTIMO
CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO, PARA
PSEUDOMONAS AERUGINOSA Y *BACILLUS CEREUS*,
PRESENTES EN SUELOS QUE CONTIENEN
HIDROCARBUROS (TPH), PROVENIENTES DE
PETROAMAZONAS S.A., UBICADO EN LA PROVINCIA
DE SUCUMBÍOS**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

MARÍA DANIELA CÓRDOBA PIZARRO

SANGOLQUÍ, 26 de Mayo de 2009

LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

María Daniela Córdoba Pizarro

DIRECTOR DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Ing. Rafael Vargas

SECRETARIO ACADÉMICO

Ab. Vinicio Zavala

Lugar y fecha: _____

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. **MARÍA DANIELA CÓRDOBA PIZARRO** como requerimiento parcial a la obtención del título de **INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**.

Fecha

M. Sc. Alma Koch Kaiser

Ing. Patricia Moreira

REVISADO POR

Ab. Vinicio Zavala

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi abuelito Jorge que está en el cielo y a mi abuelita María, que junto con mis padres, fueron el instrumento vital para hacer de una niña una mujer fuerte y responsable, que lucha por sus ideales y sus sueños.

María Daniela Córdoba Pizarro.

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar un agradecimiento muy especial a Petroamazonas S.A. sobretodo a los Departamentos de SSA y Construcciones, quienes me apoyaron en todos los requerimientos para la realización de este proyecto. Muchas gracias por su interés, apoyo, cariño, respeto y conciencia por cuidar nuestro Medio Ambiente y Nuestro Planeta.

A la Escuela Politécnica del Ejército por haberme permitido realizar mis experimentos y análisis en el laboratorio de Microbiología. A la Master Sc. Alma Koch y a la Ing. Patricia Moreira por haberme apoyado con sus conocimientos profesionales y humanos, y sobretodo por brindarme su amistad a los largo de mi carrera universitaria y en la realización de mi tesis. Al Ing. Marco Taipe por su disponibilidad frente a todas las dudas que tuve al inicio de mi proyecto y en la culminación del mismo.

A mi Mentora y Amiga, la Doctora Betty, quien compartió conmigo su experiencia y conocimientos en Microbiología. Siempre me brindó su mano para cualquier problema o inquietud, sea cual sea la hora, en Quito o en el Oriente.

A mis hermosos abuelitos, a mis increíbles padres, a mis queridos hermanos y tíos, quienes siempre estuvieron apoyándome y dándome fuerzas para cumplir este sueño profesional, siendo mi refugio cuando tenía una sonrisa o una lágrima en mi cara.

A mis hermosas amigas del colegio y del fútbol y a mis querid@s amig@s de la Universidad, gracias por brindarme su confianza, su cariño y sobretodo su apoyo en la realización de mi tesis.

A mi Diosito Hermoso, quien ha ido guiando todos los pasos de mi vida y a quién me entrego según sea su voluntad. A mi preciosa Dolorosita, al Santo Padre San José María y a mi Santa Juana de Arco, a quienes me encomendé el primer día de clases en la Universidad y con quienes salgo triunfante de la misma.

María Daniela Córdoba Pizarro.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTADO DE TABLAS	xi
LISTADO DE CUADROS	xii
LISTADO DE FIGURAS	xiii
LISTADO DE GRÁFICAS	xv
LISTADO DE ANEXOS	xvi
RESUMEN	xviii
ABSTRACT	xix

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1.	Formulación del Problema	1
1.2.	Justificación del Problema	2
1.3.	Objetivos	3
1.3.1.	Objetivo General	3
1.3.2.	Objetivos Específicos	3
1.4.	Marco Teórico	5
1.4.1.	Biorremediación	5
1.4.2.	Condiciones para la Biorremediación	5
1.4.3.	Diversos tipos de tecnologías de biorremediación de suelos	6
1.4.4.	Ventajas de las tecnologías de biorremediación	7

1.4.5.	Bacterias degradadoras de hidrocarburos.....	8
1.4.6.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
1.4.6.1.	Enfermedades ocasionadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.4.7.	<i>Bacillus cereus</i>	12
1.4.7.1.	Enfermedades ocasionadas por <i>Bacillus cereus</i>	14
1.4.8.	Estudios relacionados con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>B. cereus</i> en biorremediación.....	14
1.4.9.	Biorremediación mediante el uso de cultivos mixtos.....	18
1.4.9.1	Consortios definidos.....	19
1.4.9.1	Consortios no definidos.....	19
1.4.10.	Simbiosis entre organismos.....	20
1.4.10.1	Mutualismo.....	20
1.4.10.2	Comensalismo.....	21
1.4.10.3	Neutralismo.....	21
1.4.10.4	Parasitismo.....	21
1.4.10.5	Antagonismo.....	21
1.4.11.	El Petróleo y su composición.....	22
1.4.11.1	Compuestos derivados del petróleo.....	23
1.4.12	Contaminantes del suelo.....	24
1.4.13	Fuentes de contaminación de suelos.....	24
1.4.14	Presencia de hidrocarburos en el suelo.....	25
1.4.15	Consecuencias ambientales, sociales y económicas ocasionadas por derrames petroleros.....	26
1.5.	Hipótesis.....	28

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.	Participantes.....	29
2.2.	Zona de estudio.....	29
2.3.	Período de inicio de la investigación.....	30

2.4.	Diseño Experimental.....	30
2.5.	Procedimientos.....	30
2.5.1.	Determinación de la pureza bacteriana de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus cereus</i>	30
2.5.1.1	Identificación macroscópica bacteriana.....	31
2.5.1.2.	Identificación microscópica bacteriana.....	32
2.5.1.3.	Identificación de género y especie. Claves de identificación-Sistema API.....	32
2.5.1.3.1	API 50 CH para <i>Bacillus cereus</i>	33
2.5.1.3.2	API 20E para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
2.6.	Pruebas de antagonismo entre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus cereus</i>	35
2.7.	Determinación de la Fuente de Carbono y Cinética Bacteriana Óptimas.....	37
2.7.1.	Medición de la absorbancia para los tratamientos con diesel, gasolina-extra y fuente de carbono.....	39
2.7.2.	Medición de la absorbancia para los tratamientos con tolueno y hexano.....	39
2.8.	Análisis estadístico.....	39

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

3.1.	Determinación de la pureza bacteriana de <i>P. aeruginosa</i> y <i>Bacillus cereus</i>	41
3.1.1.	Identificación macroscópica general y selectiva de las bacterias.....	41
3.1.2.	Determinación microscópica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus cereus</i>	45
3.1.3	Pruebas de identificación de género y especie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus cereus</i>	46
3.2.	Determinación de presencia o ausencia de antagonismo bacteriano	

entre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus cereus</i>	50
3.2.1. Placa de agar con discos de papel.....	50
3.2.2. Método de los pozos por halos de inhibición.....	51
3.3. Análisis Estadístico: determinación de la fuente de carbono y cinética bacteriana óptimas para el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> y <i>Bacillus cereus</i>	52
3.3.1. Curvas cinéticas de crecimiento bacteriano.....	52
3.3.1.1. Curvas cinéticas de crecimiento bacteriano en medio mineral sin fuente de carbono.....	53
3.3.1.2. Curvas cinéticas de crecimiento bacteriano en medio mineral con gasolina-extra.....	54
3.3.1.3. Curvas cinéticas de crecimiento bacteriano en medio mineral con diesel.....	56
3.3.1.4. Curvas cinéticas de crecimiento bacteriano en medio mineral con Hexano.....	57
3.3.1.5. Curvas cinéticas de crecimiento bacteriano en medio mineral con Tolueno.....	58
3.3.1.6. Curvas cinéticas de crecimiento bacteriano en los diferentes tratamientos de fuentes de carbono.....	60
3.4. Análisis de datos por medio del programa estadístico SAS para la determinación de la fuente de carbono y cinética bacteriana óptimas.....	60

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

4.1. Pureza Bacteriana de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus cereus</i>	63
4.1.1. Determinación de las características macroscópicas y microscópicas de las bacterias.....	63
4.1.2. Pruebas de identificación de género y especie de <i>P. aeruginosa</i> y <i>Bacillus cereus</i>	64
4.2. Antagonismo bacteriano entre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus cereus</i>	65

4.3.	Determinación de la fuente de carbono y cinética bacteriana óptimas para el crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus cereus</i>.....	66
4.4.	Análisis estadístico para determinación de la fuente de carbono y cinética bacteriana óptimas en el crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus cereus</i>.....	69
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....		71
CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES.....		73
CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA.....		74
ANEXOS.....		85

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Propiedades físicas, estructura química y usos de algunos derivados del petróleo.....	24
Tabla 2.1 Operacionabilidad de las variables dependientes e independientes en el análisis macroscópico.....	31
Tabla 2.2 Operacionabilidad de las variables dependientes e independientes en el análisis microscópico.....	32
Tabla 2.3 Determinación de la absorbancia en cada uno de los tratamientos con diferentes fuentes de carbono, mediante el uso del Espectrofotómetro.....	37
Tabla 2.4 Formulación del Medio Mínimo Mineral.....	38
Tabla 3.1 Resultados de identificación de género y especie (Sistema API 50CH) para <i>B.cereus</i> a 35°C después de 24 y 48 horas de incubación.....	48
Tabla 3.2 Resultados de identificación de género y especie (sistema API 20E) para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> después de 24 y 48 horas de incubación a 35°C..	49

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 2.1	Determinación del crecimiento de las bacterias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus cereus</i> mediante la técnica Placa de agar con discos de papel.....	36
Cuadro 2.2	Determinación del crecimiento de las bacterias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus cereus</i> mediante la técnica Método de los pozos por halos de inhibición.....	36
Cuadro 3.1	Características macroscópicas de <i>Bacillus cereus</i> y <i>P. aeruginosa</i> en Agar Nutriente a las 24 horas de incubación a 35°C.	41
Cuadro 3.2	Características macroscópicas de <i>Bacillus cereus</i> y <i>P. aeruginosa</i> en los medios de cultivo selectivos. Agar cetrimide (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) y Agar <i>Bacillus cereus</i> (<i>Bacillus cereus</i>) a las 24 horas de incubación a 35°C.....	43
Cuadro 3.3	Características microscópicas de <i>Bacillus cereus</i> y <i>P. aeruginosa</i> por medio del microscopio óptico en lente de inmersión de 100X. A las 24 horas de incubación a 35°C.....	45
Cuadro 3.4	Determinación del crecimiento de las bacterias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus cereus</i> mediante la técnica Placa de agar con discos de papel, en agar nutriente por 24 horas a 35°C.	51
Cuadro 3.5	Determinación del crecimiento de las bacterias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus cereus</i> mediante la técnica de pozos por halos de inhibición, en agar nutriente por 24 horas a 35°C.....	52
Cuadro 3.6	Datos para el análisis estadístico con las diferentes fuentes de carbono en medio mineral con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus cereus</i>	61
Cuadro 3.7	Análisis del ANOVA a partir de los datos obtenidos de las áreas bajo la curva de los tratamientos en Medio Mineral con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus cereus</i>	62
Cuadro 3.8	Prueba de significancia de Tukey para las diferentes fuentes de carbono en el Medio Mineral con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus cereus</i>	62

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Vista macroscópica en caja petri (100x10 mm), del crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en Agar Cetrimide.....	10
Figura 1.2 Vista de <i>Bacillus cereus</i> a través del microscopio óptico en 100X.....	12
Figura 1.3 Vista macroscópica en caja petri (100x10 mm), del crecimiento de <i>Bacillus cereus</i> en Agar Nutritivo.....	13
Figura 2.1 Sistema de galerías API 50CH.....	33
Figura 2.2 Galerías de pruebas Bioquímicas API 20CH.....	34
Figura 2.3 Placa de agar con discos de papel.....	35
Figura 2.4 Método de los pozos por halos de inhibición.....	36
Figura 3.1 Vista macroscópica en caja petri del crecimiento de <i>Bacillus cereus</i> en Agar Nutriente durante un período de incubación de 24 horas a 35°C.....	42
Figura 3.2 Vista macroscópica en caja petri del crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> en Agar Nutriente durante un período de incubación de 24 horas a 35°C.....	42
Figura 3.3 Comparación entre el crecimiento en caja petri de los medios de cultivo agar nutriente sin inóculo y agar nutriente con <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
Figura 3.4 Vista macroscópica en caja petri del crecimiento de <i>B. cereus</i> en Agar Bacillus cereus durante un período de incubación de 24 horas a 35°C.....	44
Figura 3.5 Vista macroscópica en caja petri del crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> en Agar Cetrimide durante un período de incubación de 24 horas a 35°C.....	44
Figura 3.6 Vista de <i>Bacillus cereus</i> a través del microscopio óptico con aceite de inmersión a 100X.....	45
Figura 3.7 Vista de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a través del microscopio óptico con aceite de inmersión a 100X.....	46
Figura 3.8 Galería de pruebas bioquímicas API 50CH para <i>Bacillus cereus</i> , después de 48 horas de incubación a 35°C.....	47
Figura 3.9 Galería de pruebas bioquímicas API 20E para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , después de 48 horas de incubación a 35°C.....	47
Figura 3.10 Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en todo el medio Agar Nutriente y crecimiento de <i>Bacillus cereus</i> en los discos de papel. Ausencia de halos de inhibición entre las bacterias.....	50

Figura 3.11 Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en todo el medio Agar Nutriente y crecimiento de *Bacillus cereus* en los discos de papel. Ausencia de halos de inhibición entre las bacterias.....51

LISTADO DE GRÁFICAS

Gráfica 3.1: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral sin fuente de carbono. Tiempo (horas) vs. Absorbancia (540 nm).....	53
Gráfica 3.2: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral sin fuente de carbono. Tiempo (horas) vs. Concentración bacteriana (millones/mL).....	54
Gráfica 3.3: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral con Gasolina-extra. Tiempo (horas) vs. Absorbancia (540 nm).....	55
Gráfica 3.4: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral con Gasolina-extra. Tiempo (horas) vs. Concentración bacteriana (millones/mL).....	55
Gráfica 3.5: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral con Diesel. Tiempo (horas) vs. Absorbancia (540 nm).....	56
Gráfica 3.6: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral con Diesel. Tiempo (horas) vs. Concentración bacteriana (millones/mL).....	57
Gráfica 3.7: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral con Hexano. Tiempo (horas) vs. Absorbancia (540 nm).....	57
Gráfica 3.8: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral con Hexano. Tiempo (horas) vs. Concentración bacteriana (millones/mL).....	58
Gráfica 3.9: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral con Tolueno. Tiempo (horas) vs. Absorbancia (540 nm).....	59
Gráfica 3.10: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral con Tolueno. Tiempo (horas) vs. Concentración bacteriana (millones/mL).....	59
Gráfica 3.11: Curvas cinéticas de crecimiento bacteriano en medio Mineral con las diferentes fuentes de carbono. Tiempo (horas) vs. Absorbancia (540 nm).....	60

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A(a) Estructura química y propiedades físico-químicas del tolueno.....	85
ANEXO A(b) Estructura química y propiedades físico-químicas del hexano.....	86
ANEXO B Tabla de disolventes más usados en la industria química donde se muestra la fórmula química semi-desarrollada y su polaridad descendente.....	87
ANEXO C Relación entre la concentración bacteriana (millones/mL) y la absorbancia (540 nm) a escala de McFarland 2.....	88
ANEXO D Gráfica de la escala de Mcfarland 2 (540 nm). Relación entre concentración bacteriana vs. Absorbancia.....	89
ANEXO E. Crecimiento bacteriano en el Medio Mineral sin fuente de carbono. Datos de absorbancia a una longitud de 540 nm durante 24 horas.....	90
ANEXO F Concentración bacteriana (millones/mL) en medio Mineral sin fuente de carbono por un período de 24 horas a 35°C de incubación. La concentración y absorbancias teóricas son valores establecidos a escala de McFarland 2.....	91
ANEXO G Crecimiento bacteriano en el Medio Mineral con Gasolina-extra. Datos de absorbancia a una longitud de 540 nm durante 24 horas.....	92
ANEXO H Concentración bacteriana (millones/mL) en medio Mineral con gasolina-extra por un período de 24 horas a 35°C de incubación. La concentración y absorbancias teóricas son valores establecidos a escala de McFarland 2.....	93
ANEXO I Crecimiento bacteriano en el Medio Mineral con Diesel. Datos de absorbancia a una longitud de 540 nm durante 24 horas.....	94
ANEXO J Concentración bacteriana (millones/mL) en medio Mineral con diesel por un período de 24 horas a 35°C de incubación. La concentración y absorbancias teóricas son valores establecidos a escala de McFarland 2.....	95
ANEXO K Crecimiento bacteriano en el Medio Mineral con Hexano. Datos de absorbancia a una longitud de 540 nm durante 24 horas.....	96

ANEXO L	Concentración bacteriana (millones/mL) en medio Mineral con hexano por un período de 24 horas a 35°C de incubación. La concentración y absorbancias teóricas son valores establecidos a escala de McFarland 2.....	98
ANEXO M	Crecimiento bacteriano en el Medio Mineral con Tolueno. Datos de absorbancia a una longitud de 540 nm durante 24 horas.....	100
ANEXO N	Concentración bacteriana (millones/mL) en medio Mineral con hexano por un período de 24 horas a 35°C de incubación. La concentración y absorbancias teóricas son valores establecidos a escala de McFarland 2.....	102
ANEXO O	Valores del área bajo la curva de cada una de las repeticiones de los tratamientos experimentales en Medio Mineral con <i>P. aeruginosa</i> y <i>B. cereus</i>	104

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue el de determinar la fuente de carbono óptima en el medio mineral y así bioaumentar a *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*, bacterias específicas y especializadas en la biodegradación de hidrocarburos presentes en suelos que contienen petróleo.

Estas bacterias fueron aisladas por la empresa Qmax y entregadas para este proyecto. Se realizaron análisis macroscópicos y microscópicos para comprobar su pureza. De igual manera se utilizó las claves de identificación API para confirmar su género y especie. Para determinar si *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* son capaces de vivir en el mismo medio sin ningún tipo de competencia, se realizaron pruebas de antagonismo mediante dos técnicas: placa de agar con discos de papel y pozos por halos de inhibición. Para la obtención de la fuente de carbono óptima, se incubó a *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* en el Medio Mínimo Mineral (35°C) con diferentes hidrocarburos y se realizó un diseño completamente al azar (DCA). Se evaluaron cuatro (4) tratamientos (gasolina-extra, diesel, tolueno y hexano) y un tratamiento control (sin fuente de carbono). Se midió a cada hora la absorbancia (540 nm) de las muestras bacterianas en los diferentes tratamientos, para posteriormente analizarlas en el programa estadístico SAS donde se realizó el análisis de varianza y prueba de significancia de Tuckey.

Se determinó que las bacterias entregadas por Qmax eran las requeridas para la investigación. Sus características macroscópicas, microscópicas y claves de identificación demostraron que las bacterias son del género y especie requeridos. Tanto *Pseudomonas aeruginosa* como *Bacillus cereus* pueden vivir en el mismo medio de cultivo sin la formación de halos de inhibición y no existe ningún tipo de competencia entre ellas. Se determinó que la gasolina-extra (35°C) fue la mejor fuente de carbono, que estimuló en menos de 24 horas un desarrollo óptimo, a diferencia de los demás tratamientos donde el crecimiento bacteriano fue después de 48 horas.

ABSTRACT

The principal goal for doing this research was to determine the optimum carbon source in the mineral medium in order to make *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus* grow. These bacteria are specific and specialized in the biodegradation of hydrocarbons which are in soil contaminated by petroleum.

These bacteria were isolated from the Qmax enterprise and delivered to this project. Macroscopic and microscopic analyses were done to check their purity. In the same way, the API identification keys were used to confirm their gender and specie. Antagonism tests were done to determine if *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus* are able to live in the same medium without competition, using the agar plate with paper discs technique and the wells by inhibition halos technique. Besides, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus* were incubated in the minimum mineral medium (35°C) with different hydrocarbons to obtain the optimum carbon source. Four treatments were evaluated (gasoline, diesel, toluene, hexane) and a control treatment (without carbon source). It was measured the absorbance (wavelength 540 nm) of samples of the different treatments each hour, and, using the statistical program SAS, the results were analyzed by an ANOVA and the significance test of Tuckey.

It was determined that bacteria delivered by Qmax were the required for this investigation. Their macroscopic and microscopic characteristics and the identification keys demonstrated that bacteria belong to the required gender and specie *P. aeruginosa* and *Bacillus cereus* are able to live in the same medium without the formation of inhibition halos and no competition between them. Finally, it was determined that gasoline (35°C) was the best carbon source which stimulated an optimum development of bacteria in less than 24 hours. The other treatments stimulated bacteria growing in more than 48 hours.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del Problema

El manejo inadecuado de los materiales y residuos peligrosos ha generado a escala mundial, un problema de contaminación de suelos, aire y agua (Restrepo, 2002).

Los derrames de petróleo son accidentes que eventualmente ocurren por fallas humanas, por problemas de mantenimiento de los equipos o de los sistemas, por roturas de tuberías, entre otros. En el caso de Ecuador, se puede decir que la contaminación a gran escala comenzó con la modernización del Estado a partir de la primera Reforma Agraria en 1963, y que se afianzó con el auge petrolero a partir de la década de 1970 (Domínguez & García, 1999).

Los métodos físicos y/o dispersantes químicos utilizados para favorecer la remediación de los ambientes contaminados pueden ocasionar un mayor impacto ecológico que el mismo derrame, debido a su toxicidad y recalcitrancia (Bonilla *et al.*, 1999). Por esta razón una excelente alternativa es la biorremediación, proceso que consiste en el uso de plantas o microorganismos como: hongos, bacterias naturales o modificadas genéticamente, para neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas en compuestos con menor impacto ambiental o convirtiéndolas en inocuas para la salud humana (Van Hamme *et al.*, 2003). En la biodegradación de hidrocarburos, las bacterias de mayor uso y mayor capacidad degradativa son: *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*. Estas bacterias sobresalen de las demás por su extraordinaria capacidad de adaptación, ya que, viven en ambientes muy diversos y extremos (Ruales, 2005).

Para todo proceso de biorremediación se requieren primeramente estudios de laboratorio para conocer la manera de actuar de la o las bacterias a utilizar, establecer sus condiciones físicas, químicas y biológicas óptimas donde se van a desarrollar. Una

vez establecidos estos parámetros ir poco a poco escalando el experimento a diferentes volúmenes, estableciendo y controlando las posibles variaciones de pH, temperatura, humedad que se puede tener. Hay que considerar que las condiciones de laboratorio pueden cambiar cuando el experimento se lo escala a nivel de campo, por esta razón es indispensable ir adaptando paulatinamente a las bacterias y ver de qué manera se pueden mantener estables y controlados los parámetros, para que su crecimiento sea el óptimo.

1.2. Justificación del Problema

En el Ecuador, el transporte de crudo y sus derivados se ha visto afectado considerablemente durante los últimos 35 años, por una permanente actividad terrorista contra los oleoductos e instalaciones petroleras (Restrepo, 2002). Desde 1972, compañías internacionales en colaboración con Petroecuador, han extraído millones de barriles de petróleo de la Amazonía Ecuatoriana, son responsables de la deforestación de 2 millones de hectáreas y de derrames de más de 650.000 barriles de crudo en bosques, ríos y esteros (Domínguez & García, 1999).

En la constitución Política del Ecuador, Capítulo II: De los Derechos civiles y Políticos, artículo 23, numeral 6 establece: “El derecho a vivir en un ambiente sano, ecológicamente equilibrado y libre de contaminación. La ley establecerá las restricciones al ejercicio de determinados derechos y libertades, para proteger el medio ambiente”. Artículo 23, Numeral 20: “El derecho a una calidad de vida que asegure la salud, alimentación y nutrición, agua potable, saneamiento ambiental; educación, trabajo, empleo, recreación, vivienda, vestido y otros servicios sociales necesarios” (Constitución Política del Ecuador, 1998).

Los niños del Ecuador y de todas las partes del mundo merecen vivir en un ambiente sano donde las sustancias nocivas para su salud no superen los límites de concentración máximos permisibles. Nosotros como futuros Ingenieros en Biotecnología tenemos el deber de cuidar, proteger y tratar el medio ambiente que ha sufrido daños; por el momento pueden ser reversibles pero si nos quedamos de brazos cruzados “Nuestro Hogar” se puede desmoronar.

Por medio de la Biorremediación se podrán recuperar varias extensiones de terrenos y acuíferos que contienen petróleo. Este estudio es la pauta para que a nivel de laboratorio, se puedan adaptar bacterias para que consuman un mismo alimento que contenga hidrocarburos y poco a poco ir escalando a volúmenes grandes, de tal manera que el medio ambiente en un corto plazo se pueda ir saneando. Es necesario conocer la biología y cinética de los microorganismos a utilizar, saber si pueden desarrollarse ante la presencia de compuestos contaminantes; si son patógenos para los seres vivos, puesto que, pueden biodegradar los hidrocarburos pero también afectar la micro (macro) flora y fauna de nuestro país e incluso afectar a los seres humanos.

Para todo proceso de biorremediación se necesitan bases científicas que se combinen con la experiencia empírica manteniendo siempre las normas de seguridad en el laboratorio y fuera de él. De esta manera científicos ecuatorianos y extranjeros podrán encontrar nuevas biotecnologías alternativas para el tratamiento y cuidado ambiental

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Desarrollar un medio de cultivo óptimo con diferentes fuentes de carbono: tolueno, hexano, gasolina-extra y diesel; para bioaumentar bacterias específicas y especializadas en la degradación de hidrocarburos presentes en suelos que contienen petróleo.

1.3.2. Objetivos Específicos

- 1.3.1.1.** Comprobar la pureza de las muestras bacterianas, mediante una identificación diferencial: macroscópica, microscópica y claves de identificación de género y especie de las bacterias.

1.3.1.2. Realizar pruebas de antagonismo bacteriano.

1.3.1.3. Determinar el medio de cultivo óptimo, con diferentes fuentes de carbono, que produzca el mejor crecimiento bacteriano.

1.3.1.4. Analizar y comparar curvas de crecimiento cinético de las bacterias en los diferentes tratamientos.

1.4. Marco Teórico

1.4.1. Biorremediación

La degradación mediante el uso de microorganismos constituye el principal proceso de descontaminación natural (Prince, 1993). Éste se puede acelerar y/o mejorar mediante tecnologías de biorremediación (Alexander, 1991). El petróleo se caracteriza por ser una matriz contaminante que contiene una elevada diversidad de compuestos, por lo que es un sustrato ideal para evaluar el potencial catabólico de cepas o consorcios microbianos (Viñas, 2005).

El estudio de los procesos de biorremediación tiene un gran interés, principalmente porque se restauran los ecosistemas. En sus procesos metabólicos, los microorganismos transforman los nutrientes que obtienen del ambiente en sustancias más simples, y en este proceso obtienen materia y energía que utilizan para su subsistencia (Cerniglia, 1993). La mayor parte de los estudios realizados se han llevado a cabo con cepas bacterianas individuales o con la combinación de diferentes cepas aisladas (Bayona *et al.*, 1986). En la mayoría de los casos, son degradadoras de alcanos, debido a que los alcanos son los componentes más abundantes del crudo de petróleo. Existen, por ejemplo, microorganismos capaces de nutrirse a partir de hidrocarburos, detergentes o bifenilos policlorados, de manera que su metabolismo los convierte en productos inocuos para el medio ambiente (Viñas, 2005).

Las bacterias responsables de la biorremediación, los procesos bioquímicos que llevan a las reacciones de degradación, así como los genes que codifican las enzimas responsables de estos procesos se están analizando, tanto para un conocimiento desde un punto de vista básico como aplicado (Parés, 1997).

1.4.2. Condiciones para la biorremediación

La selección del método de biorremediación a utilizar depende de varios factores: los microorganismos presentes en el medio contaminado, la concentración y toxicidad del contaminante y las condiciones del medio (Alexander, 1981).

Para que la biorremediación tenga lugar, los microorganismos utilizados deben presentar una actividad adecuada. Para lograrlo se deben generar óptimas condiciones medioambientales (nutrientes, temperatura, oxígeno), químicas (viscosidad, solubilidad, toxicidad) y físicas que favorezcan el crecimiento de la población de microorganismos. Esto, a su vez, provocará un aumento en la velocidad de biodegradación de los compuestos contaminantes, y con ello la destoxificación del medio (Alexander, 1991).

La biorremediación puede tener lugar bajo condiciones aerobias o anaerobias (en presencia o en ausencia de oxígeno gaseoso, respectivamente). En algunos casos, se utilizan los microorganismos presentes en forma natural en el ambiente contaminado, o microorganismos autóctonos (Alexander, 1991). En estos casos se deben mejorar los factores ambientales mediante el agregado de nutrientes como nitrógeno (N) o fósforo (P) para que los microorganismos crezcan a mayor velocidad. A este proceso se lo llama fertilización o bioestimulación (Barnard, 1998). En cambio, cuando la actividad microbiana necesaria no se encuentra en el ambiente contaminado en forma natural, se deben añadir microorganismos de otras fuentes. A esta tecnología se la denomina bioaumentación (Barnard, 1998).

1.4.3. Diversos tipos de tecnologías de biorremediación de suelos

Existen diferentes tipos de tecnologías para tratar suelos contaminados (Barnard, 1998):

- a.** Bioaumentación: Adición de microorganismos al sitio contaminando cuando la población autóctona carece de capacidad degradadora.
- b.** Bioestimulación: Adición de estimulantes en la actividad microbiana autóctona como co-sustratos o aceptores de electrones para la degradación anóxica.
- c.** Bioventeo: Introducción de oxígeno a través del suelo para estimular la población microbiana netamente aerobia.

- d. Composteo: El material contaminado se coloca sobre la superficie del terreno en forma de pilas que se cubren para crear condiciones termófilas, periódicamente se mezcla para favorecer la aceleración.
- e. Biocultivo: Tratamiento en fase sólida que generalmente se realiza en sitios confinados para retener los lixiviados que se forman.
- f. Biosorción: Uso de microorganismos con afinidad para absorber metales bajo ciertas condiciones, generalmente se aplica en fase líquida.

1.4.4. Ventajas de las tecnologías de biorremediación

La biorremediación presenta algunas ventajas a considerar (Bundy *et al.*, 2002):

- a. Son seguras, económicas y más rápidas que algunos tratamientos fisicoquímicos.
- b. Se utilizan sistemas biológicos cuyo costo es mínimo, más aún si se utiliza la población autóctona.
- c. El ecosistema del sitio contaminado prácticamente no se altera; al contrario se recupera.
- d. No se generan desechos como producto del tratamiento, ya que los contaminantes son realmente degradados.
- e. Pueden ser acoplados a otro tipo de tecnología cuando la remoción de los contaminantes no es la deseada.
- f. Los contaminantes absorbidos o atrapados en los poros del suelo, también son biodegradados.
- g. Si la actividad microbiana no es la deseada, puede estimularse con la adición controlada de compuestos requeridos.
- h. Cuando los contaminantes orgánicos son empleados como la principal fuente de carbono y energía para los microorganismos el proceso se realiza con mayor rapidez.
- i. Cuando se trata de una biorremediación *in situ* se tienen ventajas adicionales.
- j. Se eliminan costos de transportación.
- k. Al utilizar la población microbiana autóctona se elimina la necesidad de introducir microorganismos potencialmente peligrosos.

1.4.5. Bacterias degradadoras de hidrocarburos

Las bacterias desempeñan un papel importante en la biodegradación de contaminantes orgánicos en el suelo y aguas subterráneas. En los suelos bien aireados, las bacterias y los hongos son muy importantes, pero en suelos pobremente aireados solamente las bacterias son las responsables de los cambios biológicos y químicos que en él suceden (Alexander, 1991).

El número de bacterias y la presencia de especies dominantes es una función de las características del suelo y los ambientes específicos (por ejemplo la temperatura y contenido de humedad). Sin embargo la cantidad de especies presentes parece relativamente constante alrededor del mundo. Las bacterias son un grupo extremadamente diverso de organismos con variaciones extensivas de las propiedades morfológicas, ecológicas y fisiológicas y son degradadores primarios de compuestos orgánicos naturales y xenobióticos encontrados en el suelo (Alexander, 1981).

Debido a su diversidad, las bacterias se encuentran regularmente en comunidades heterogéneas. Pocas especies generalmente caracterizan el tamaño de la masa de bacterias sobre un número o masa madre. La razón que hace que una especie predomine es la existencia de una ventaja competitiva sobre el número de grupos debido a condiciones de ambiente particulares o la fuente de nutrientes disponibles. Por ejemplo muchas especies de los géneros *Pseudomonas spp.* crecen bien a temperatura relativamente baja y son capaces de degradar compuestos aromáticos como benceno, tolueno (Anexo A (a)), xileno; y compuestos tóxicos como el hexano (Anexo A (b)). (Evans & Fuchs, 1988).

El crudo de petróleo es una fuente de carbono que sirve como nutriente orgánico y energía a los microorganismos degradadores, pero es deficiente en nutrientes como: nitrógeno, fósforo y hierro los cuales son necesarios para el soporte del crecimiento microbiano. En la degradación del petróleo los microorganismos deben obtener sus nutrientes minerales esenciales del ambiente. Muchos ecosistemas están limitados en nutrientes y minerales, y no soportan una biodegradación rápida y extensa de hidrocarburo (Atlas & Bartha 2002).

Las poblaciones de bacterias mezcladas se deberían proyectar en términos de comunidades relacionadas simbióticamente. El crecimiento completo y las cantidades de contaminantes eliminados, son mejorados por la interacción de varias especies que constituyen una población. En poblaciones mezcladas y manipuladas, las especies crecen más rápidamente, están mejor adaptadas a un ambiente particular (por ejemplo la temperatura, pH, humedad, salinidad) y son más eficientes en la utilización de energía (Ingraham & Malone, 1983).

Si existe proporción óptima entre el área superficial y el volumen del suelo, entonces, el ataque bacteriano por medio de enzimas degradadoras de petróleo es mayor y se descompone aceleradamente. Por otra parte la disponibilidad de oxígeno molecular es considerada como un factor limitante para la degradación del petróleo, por ejemplo en los casos de grandes acumulaciones de aceite en los suelos de regiones de intensa descomposición o en cuerpos de agua. El desarrollo de las condiciones anóxicas puede limitar severamente la biodegradación de hidrocarburos (Clark, 1989).

1.4.6. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa pertenece a la rama de las proteobacterias. Es una bacteria gram-negativa aerobia (aceptora de electrones de O₂) o anaerobia facultativa (nitrato aceptor de electrones), constituida por flagelos y fimbrias. Tiene dos formas de desplazarse, en medios líquidos se desplaza "nadando" mediante sus flagelos, mientras que sobre las superficies se mueve, independientemente de la presencia de los flagelos, por medio de las fimbrias (Govan & Deretic, 1996).

Sus requerimientos nutricionales son mínimos por lo que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza (Fuenmayor & Rodríguez, 1992). Secreta una gran variedad de pigmentos como piocianina (azul-verdoso), fluorosceína (amarillo-verdoso fluorescente) y piorubina (rojo pardo). Puede crecer a temperaturas superiores a los 42 °C, sin embargo su temperatura óptima se encuentra en los 35°C a un pH entre 6,0-8,0 (Fuenmayor & Rodríguez, 1992). Su tamaño oscila entre 1 a 5 µm de largo y 0.5 a 1 µm de ancho.

Sobresale de entre las bacterias por su extraordinaria capacidad de adaptación, ya que, vive en ambientes muy diversos. Tiene diversas aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en el área ambiental. Es uno de los pocos organismos capaces de degradar alcanos de cadena ramificada que provienen de biosurfactantes, útiles para la limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos o con metales pesados y de igual manera posee una gran capacidad para catabolizar distintos hidrocarburos aromáticos y alifáticos (Chaineau *et al.*, 1995).

Esta bacteria presenta características específicas en el medio de cultivo Agar Cetrimide (Figura 1.1). El agar Cetrimide estimula la producción de piocianina y la fluorescencia de *P. aeruginosa*. Las colonias presentan una coloración beige o perla, cambiando el color del medio de cultivo de amarillo a verde; su forma es circular, de superficie lisa y borde entero. Bajo el microscopio presenta una coloración gram negativa y forma de coco-bacilos (Baltch &Smith, 1994).

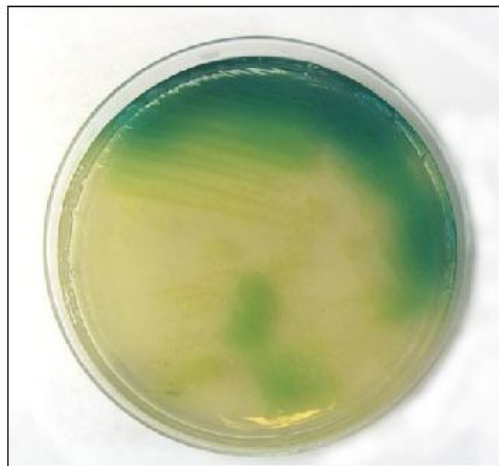


Figura 1.1: Vista macroscópica en caja petri (100x10 mm), del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en Agar Cetrimide (Fuenmayor & Rodríguez, 1992).

La degradación de hidrocarburos y de otros compuestos orgánicos mediante *Pseudomonas aeruginosa* es realizada con eficiencia dependiendo de la estructura del hidrocarburo (lineal o ramificado, alifático o aromático) y de la presencia de átomos sustituyentes. Algo similar ocurre con la biodegradación de compuestos insecticidas, herbicidas, detergentes y emulgentes (Todar, 2000).

Estudios relacionados al desempeño metabólico de *Pseudomonas aeruginosa* ha permitido identificar la capacidad de sintetizar ramnolípidos cuando se encuentra en la fase estacionaria de su crecimiento, por tal razón esto sólo se puede realizar en la primera fase del proceso de biorremediación y contribuyendo así con la movilización y solubilización de los contaminantes durante la fase siguiente de mineralización. Al mismo tiempo que pueden transformarse bajo microcosmos en el suelo con un tratamiento físico o químico específico, característica que comparte con el *Agrobacterium tumefaciens* (Todar, 2000).

Presenta una versatilidad metabólica muy grande que se traduce en su capacidad de utilizar como fuente de carbono substratos muy variados como tolueno, hexano, gasolina-extra, diesel (Ruales, 2005). Estudios realizados en Venezuela demostraron la degradación de algunos hidrocarburos aromáticos por medio de bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, y *Staphylococcus* (Soto, 2001; Rivera, 2000). Otros estudios han determinado el desempeño metabólico de *Pseudomonas aeruginosa* y su capacidad para biodegradar sustratos como el n-hexano; mineralizar compuestos alifáticos, hidrocarburos aromáticos y poli-aromáticos (Williams *et al.*, 1995; Leahy & Colwell 1990).

Otros trabajos demuestran también que los géneros *Flavobacterium* y *Pseudomonas* son los microorganismos más aislados en la fase de degradación de los TPH (Plaza *et al.*, 2001). En Lima Perú se determinó que *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia rubidae* presentan una alta actividad degradativa y emulsificante (Merino, 1998; Arenas, 1999). De igual manera se determinó que el consorcio bacteriano conformado por *Pseudomonas aeruginosa* 4k-1, *Bacillus sp.* 6Bh-1 y *Serratia rubidae* 6B9 presentaron una alta actividad emulsificante y gran capacidad para degradar significativamente el crudo de petróleo (Escalante, 2002).

1.4.6.1. Enfermedades ocasionadas por *Pseudomonas aeruginosa*

Debido a su habilidad de sobrevivir en ambientes húmedos y de poseer una resistencia innata a los antibióticos, esta bacteria es considerada un patógeno oportunista (Murray *et al.*, 1995). Pueden producir infecciones serias en pacientes

inmunológicamente deprimidos; la virulencia de éstos agentes radica en su capacidad de colonizar varios sitios anatómicos humanos, la propiedad para invadir tejidos y producir daño tisular. Además de la tendencia característica de invadir torrente sanguíneo. *P. aeruginosa* puede encontrarse produciendo infecciones en piel de pacientes quemados, personas con fibrosis quística, cáncer y una gran variedad de infecciones (Baltch & Smith, 1994).

1.4.7. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus es una bacteria gram-positiva, perteneciente a la familia Bacillaceae, aerobio o anaerobio facultativo, produce esporas (ovoidea-central) (Figura 1.2) que son moderadamente resistentes al calor (100 °C durante 5-10 minutos). Posee movilidad gracias a sus flagelos. Crece entre los 10-48°C, sin embargo su rango de temperatura óptima está entre 28 - 40°C, posee amplios rangos de pH 4,9-9,3 (Atlas & Bartha, 2002).

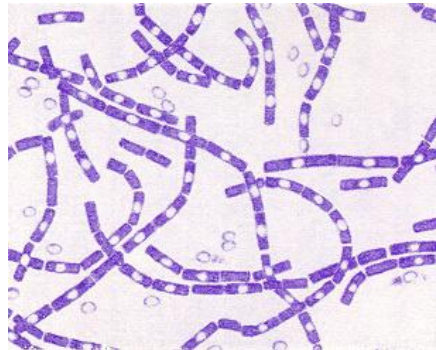


Figura 1.2: vista de *Bacillus cereus* a través del microscopio óptico en 100X (Buesa, 1981).

Las cepas de *B. cereus* son muy variables en cuanto a su crecimiento y características de supervivencia. Algunas son psicrófilas, siendo capaces de crecer a 4-5°C, mientras que otras cepas son mesófilas y pueden crecer entre los 45 °C y los 55 °C (Benavides *et al.*, 2004).

Produce una enzima llamada lecitinasa (fosfolipasa), se puede detectar porque estos microorganismos dan lugar a una reacción típica de precipitación cuando crecen en el medio de cultivo Agar yema de huevo. Presenta características específicas en el medio de cultivo Agar *Bacillus cereus* (Figura 1.3). En medios de cultivo generales como Agar Nutriente, las colonias presentan una coloración beige opaca, conservando el color amarillo del medio de cultivo; poseen forma irregular, de superficie rugosa y borde lobulado, su tamaño puede alcanzar los 5 mm en 24 horas. Bajo el microscopio óptico presentan coloración gram positiva y tienen forma de bastoncillos (bacilos) (Buesa, 1981).



Figura 1.3: Vista macroscópica en caja petri (100x10 mm), crecimiento de *B.cereus* en Agar Nutritivo (Buesa, 1981).

Algunos estudios realizados en Venezuela identificaron y caracterizaron los microorganismos presentes en suelos contaminados con crudos extra-pesados y diversos hidrocarburos poliaromáticos modelos (HAPs). Entre las bacterias que se encontraron la que en mayor porcentaje estaba era *Bacillus cereus* 68%, *Bacillus sphaericus* 32% y *Rhodococcus erythropolis* 21% (PDVSA, 2006).

Petroamazonas S.A. ha realizado trabajos donde emplearon consorcios bacterianos puros. Uno de estos estudios fue el uso de *Bacillus cereus* en la degradación de diesel, gasolina-extra, tolueno y hexano en Medio Mínimo Mineral. La fuente de carbono que estimuló un mayor crecimiento fue la gasolina-extra debido a su polaridad, volatilidad y a la presencia de cadenas alifáticas de fácil degradación por este microorganismo (Ruales, 2006).

1.4.7.1 Enfermedades ocasionadas por *Bacillus cereus*

Bacillus cereus es el causante de dos tipos de enfermedades transmitidas por los alimentos: la intoxicación emética (con vómitos) causada por la ingestión de toxina (cereulida) preformada en el alimento y una infección diarreica causada por la ingestión de células/ esporas bacterianas que producen enterotoxinas en el intestino delgado. Adicionalmente, se sabe que la enfermedad diarreica es causada por una proteína de alto peso molecular, mientras que se cree que la enfermedad emética (con vómitos) es causada por un péptido termoestable de bajo peso molecular (Buesa, 1981).

Una amplia variedad de alimentos incluyendo las carnes, la leche, los vegetales y los pescados han sido asociados al envenenamiento alimentario de tipo diarreico. Por otro lado, el desencadenamiento del tipo de enfermedad con vómitos ha sido generalmente asociado a los productos elaborados a base de arroz; aunque otros alimentos con alto contenido de almidón como las papas, las pastas y los quesos también han sido involucrados. Las mezclas de alimentos como las salsas, los pudines, las sopas, los guisos, las pastas y las ensaladas han sido frecuentemente relacionados con los envenenamientos alimentarios (Buesa, 1981).

1.4.8. Estudios relacionados con *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* en biorremediación

Se han reportado algunos trabajos sobre la biodegradación efectiva del petróleo en suelos contaminados, mediante el uso de técnicas que involucran el empleo de medios enriquecidos con hidrocarburos; de tal manera que las cepas se adapten a dicho compuesto y lo biodegraden; y, a su vez, limiten el desarrollo de bacterias que no presentan estas propiedades (Wick *et al.*, 2003; Benavides *et al.*, 2004). Uno de estos estudios fue realizado en la Universidad de Zulia, Venezuela (Soto, 2001; Rivera, 2000); aquí se demostró la degradación de algunos hidrocarburos por medio de bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo. El aislamiento bacteriano se llevó a cabo a través del inóculo de un gramo de suelo, en 30 mL de medio mínimo mineral y hexano al 0,05% p/v, y se incubaron a 37°C por 15 días. La capacidad degradativa de las bacterias aisladas sobre naftaleno, antraceno, tolueno, diesel y fenantreno se analizó a

través de la técnica de Kiyohara. Se aislaron un total de 37 cepas bacterianas, de las cuales 54,05% correspondieron a bastones Gram negativos, 24,32% a bastones Gram positivos y 21,62% a cocos Gram positivos. El mayor número de aislamientos por géneros fue: *Pseudomonas spp.* (54,05%) > *Bacillus spp.* (24,32%) > *Staphylococcus spp.* (16,21%) > *Micrococcus spp.* (5,40%). El 100% de las cepas estudiadas degradaron en 48 horas los hidrocarburos antraceno y diesel. El diesel fue degradado en un 100% por los cocos Gram positivos, un 83,33% por los bacilos Gram positivos y un 78,57% por bacilos Gram negativos. Se demostró la capacidad que poseen algunas bacterias provenientes de suelos contaminados con petróleo para la degradación de hidrocarburos, constituyendo éstas un potencial importante para la biorrecuperación de los sustratos impactados (Soto, 2001; Rivera, 2000).

Bracho y Laugeny (2002) pudieron observar también la adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios enriquecidos; las bacterias aisladas de los suelos poseen actividad de peroxidasa y oxigenasa, que permiten la oxidación de algunas fracciones del petróleo. Esta oxidación cambia las propiedades de los compuestos haciéndolos susceptibles a ataques secundarios y facilitando su conversión a bióxido de carbono y agua.

El laboratorio QMAX Ecuador, realizó en el 2005 un aislamiento e identificación de la flora bacteriana con capacidad metabólica, para la degradación de hidrocarburos provenientes de suelos nativos con residuos petroleros de la UB15. Las bacterias que presentaron mejor capacidad para metabolizar sustancias tóxicas del medio fueron: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Serratia rubidea*, sometidas a hexano 1%, tolueno 1%, degresol 1%, gasolina-extra 1% y diesel 1% (Ruales, 2006). Las condiciones óptimas, para el crecimiento independiente de cada una de estas bacterias son: 35°C de temperatura y un pH de 7,2. Al finalizar este estudio se pudo ver que el mejor crecimiento de estas bacterias fue en el Medio Mínimo Mineral con gasolina-extra, debido a que es una sustancia volátil, polar, que posee cadenas alifáticas lineales de fácil degradación y asimilación bacteriana (Ruales, 2006).

De igual manera, estudios realizados por Van Hamme en el 2003 muestran que la temperatura y pH ejercen una marcada influencia en la biodegradación del petróleo; la temperatura óptima para que los microorganismos degraden el crudo se encuentra en

un intervalo entre 20°C a 35°C y pH de entre 7-7,5. Sin embargo, Bossert & Bartha (1994) demostraron que las temperaturas altas, entre 30 a 40°C, incrementan al máximo la velocidad del metabolismo de los degradadores de hidrocarburos. El pH debe encontrarse entre 7,1 y 7,4 puesto que este parámetro es un factor prioritario para controlar el crecimiento bacteriano, a fin de garantizar la integridad biológica de los suelos (Kastner *et al.*, 1998).

Sabirova en Rusia (2000), aisló microorganismos halotolerantes a partir de suelo contaminados y los cultivó en un medio que contenía una mezcla de hidrocarburos y cloruro de sodio. Después de comprobar la tolerancia a las sales, inoculó el consorcio microbiano halotolerante en el suelo contaminado. Después de un mes de haber introducido la comunidad halotolerante, la concentración de hidrocarburos disminuyó a un 22% y al cabo de cinco meses a un 50%. Sabirova concluyó que en el suelo existen numerosos factores que pueden limitar el número y la actividad de los microorganismos en el suelo. Entre ellos está la salinidad, la cual ha demostrado tener un fuerte efecto inhibitorio sobre los microorganismos autóctonos y en la tasa de degradación de petróleo en suelos. Sin embargo, la inoculación de microorganismos halotolerantes adaptados a altas concentraciones salinas aumentan significativamente la tasa de degradación del petróleo en el suelo.

En Long Beach (California), aplicaron la biorremediación *in situ* en suelos contaminado con gasolina y aceite diesel mediante el uso de microorganismos autóctonos complementada con la adición de nutrientes y oxígeno en el suelo (bioestimulación), e inoculación de una mezcla enriquecida de consorcios bacterianos previamente extraída del mismo suelo, bioaumentación. Esto permitió encontrar consorcios bacterianos degradadores de hidrocarburos identificados por secuenciación de genes 16S-RNA, demostrando la presencia de *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilis*, *Acinetobacter junii*, y *Pseudomonas aeruginosa* (Bongkeun, 2000; Hideki *et al.*, 2000).

Los productos de petróleo ampliamente usados como gasolina, keroseno y diesel son contaminantes comunes del ambiente, se ha observado que la biodegradación de gasolina por microflora de suelo y agua de sitios contaminados es eficiente. Se aislaron cepas con una alta capacidad para degradar dichos compuestos (Benavides *et al.*, 2004),

identificadas como *Bacillus cereus*, *Mycobacterium austroafricanum*, *P.aeruginosa* y *Serratia rubidae*. Estos microorganismos fueron seleccionados de un acuífero contaminado con petróleo, gasolina y diesel. Las bacterias aisladas fueron identificadas por medio de la secuenciación del 16S ribosomal. Se identificó una cepa perteneciente a *Bacillus cereus*, *Mycobacterium austroafricanum*, *Pseudomonas aeruginosa* y por último a la cepa de *Serratia rubidae*. De esta manera, las bacterias utilizaron como fuente de carbono y sustrato de crecimiento n-alcanos y multimetil, donde degradó el metil t-butil eter, y grupos 3-metil, posiblemente por mecanismos de carboxilación y deacetilación; logrando finalmente la degradación del 86% de los sustratos contenidos en este sitio contaminado con estos tres hidrocarburos (Benavides *et al.*, 2004).

La degradación de gasolina a través de microorganismos autóctonos del suelo en sitios contaminados, es efectiva; se puede alcanzar un nivel de biodegradación hasta del 90% (Chaineau *et al.*, 1995). La limitación de esta microflora aparentemente se presenta a nivel de la degradación de compuestos como el n-hexano, trimetilpentano, benceno y tolueno; los cuales se presentan como compuestos recalcitrantes, de baja polaridad y tóxicos (Anexo B). La microflora degradadora de hexano, isoctano, benceno y tolueno es seleccionada directamente de las muestras tomadas del ambiente. La cepa que utiliza el hexano como única fuente de carbono no se logró aislar pura, debido a los fenómenos de metabolismo y cometabolismo involucrados en la degradación de este compuesto. En cuanto a la capacidad de degradación del benceno, tolueno y trimetilpentano resultó ser complicada en las muestras naturales, solo se aislaron a *Bacillus sphaericus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia rubidae* con esta capacidad para utilizar a estos hidrocarburos como fuentes de carbono y el uso del n-hexano como un cosustrato (Chaineau *et al.*, 1995).

Arenas en 1999, aisló 262 cepas bacterianas a partir de muestras de suelo y agua de la refinería “La Pampilla”, de las cuales se seleccionaron 55 cepas, que fueron las de mayor actividad emulsificante y de quienes se evaluó su capacidad degradativa. El 100% crecieron en medios de cultivo cuya fuente de carbono eran derivados del petróleo como gasolina, querosene y diesel; mostrando crecimientos comparables a las escalas dos, tres y cuatro de Mc. Farland. Los microorganismos aislados fueron: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. mendocina*, *Listonella damsella*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus* y *Acinetobacter calcoaceticus*.

Merino en 1998, realizó estudios con microorganismos nativos, productores de emulsificantes de petróleo. Aisló las bacterias a partir de muestras de suelo y agua, procedentes de la refinería de “La Pampilla” y evaluó su actividad degradativa y emulsificante con hidrocarburos como gasolina, diesel, benceno, antraceno y hexano. Los microorganismos con mayor capacidad degradativa fueron *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia rubidaea*. El tiempo de adaptación de estos microorganismos ante la presencia de gasolina y diesel fue inmediato; y después de 72 horas hubo crecimiento bacteriano en benceno y antraceno. En el caso del hexano las bacterias demoraron más de 24 horas para su crecimiento, debido a que es una sustancia apolar, hidrófoba y muy tóxica para los microorganismos a pesar de ser un alcano de cadena lineal (Anexo A(b)). Las propiedades de esta sustancia hacen que posea una baja solubilidad en agua, haciendo que sea difícilmente asimilado y degradado por los microorganismos, puesto que no es de fácil acceso a través de sus paredes celulares.

Tantaleán y Altamirano en 1998, realizaron el aislamiento y evaluación del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en petróleo diesel y compararon el crecimiento de tres cultivos puros y uno mixto con *Pseudomonas putida* que independiente tuvo una menor capacidad para utilizar el diesel en comparación con *P.aeruginosa*. La mejor capacidad de biodegradación de petróleo se logró en el cultivo mixto usando a *Pseudomonas aeruginosa* y a *Pseudomonas putida*.

Díaz en 1999, evaluó la biodegradación de hidrocarburos por un consorcio microbiano conformado por *Bacillus cereus*, *Serratia rubidaea*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa*. Sembraron el consorcio microbiano en medio mineral líquido, que contenía hidrocarburos (35000 ppm) como única fuente de carbono y energía, luego lo incubaron a 35°C en agitación durante 35 días con su control diario respectivo. Al cabo de este tiempo cuantificaron la concentración de hidrocarburos, obteniendo una biodegradación del 62.28%.

1.4.9. Biorremediación mediante el uso de cultivos mixtos

Se pueden utilizar cultivos mixtos como una alternativa al uso de cepas individuales. Los cultivos mixtos pueden estar conformados por consorcios definidos y no definidos. Los consorcios definidos se caracterizan por ser una combinación de cepas

aisladas con capacidades degradativas conocidas que son complementarias entre sí. (Komukai- Nakamura *et al.*, 1996; Casellas *et al.*, 1998; Foght *et al.*, 1998; Foght *et al.*, 1999). Los consorcios no definidos se caracterizan por ser el resultado de procesos directos de enriquecimiento a partir de muestras ambientales con historia previa de contaminación (Venkateswaran *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1997; Komukai *et al.*, 1996) y por lo tanto no son el resultado de una combinación de cepas previamente aisladas.

1.4.9.1 Consorcios definidos

Los consorcios definidos están bien caracterizados y son repetitivos pero tienen ciertas desventajas. En primer lugar, se necesitaría un gran número de cepas distintas para conseguir una degradación extensa del petróleo, debido a la gran cantidad de componentes presentes y al espectro metabólico limitado de una cepa bacteriana (Leahy *et al.*, 1990). De hecho, tal y como se ha descrito anteriormente, muchos degradadores de alcanos no utilizan HAPs, y entre los degradadores de HAPs, se ha descrito que, o bien degradan hidrocarburos monoaromáticos, o bien degradan HAPs de 2 a 3 anillos o de 3 a 4 anillos (Gibson y Subramanian, 1984; Van Hamme *et al.*, 2003).

Es posible la formación de metabolitos intermediarios que sean tóxicos para la misma cepa o para otras cepas existentes en el mismo (Casellas *et al.*, 1998; Kazunga & Aitken, 2000). De hecho, se ha descrito que durante la degradación de mezclas de hidrocarburos se pueden formar intermediarios de persistencia y toxicidad desconocidas, por fenómenos de cometabolismo (Grifoll *et al.*, 1995).

1.4.9.2 Consorcios no definidos

Los consorcios no definidos, especializados en la degradación de hidrocarburos, se obtienen a partir de enriquecimientos de muestras ambientales donde hayan existido episodios previos y recurrentes de contaminación por hidrocarburos. El resultado es una población microbiana seleccionada de forma natural por su cooperación metabólica en la degradación de la mezcla en cuestión, la cual potencialmente dispone de una mayor eficiencia en la degradación de compuestos

conocidos y desconocidos que un consorcio definido. Por lo tanto, es más probable que en un consorcio no definido se hayan seleccionado degradadores de productos finales que se acumulan como resultado de procesos cometabólicos (Grifoll *et al.*, 1995).

1.4.10. Simbiosis entre organismos

Entre los microorganismos pueden existir relaciones de competencia o mutualismo entre ellos. Dependiendo del tipo de bacteria, ésta puede generar efectos positivos o negativos en el medio que le rodea (Casellas *et al.*, 1998).

La competencia es el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando el uso de éste reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es que haya "escasez" de un elemento, si hay exceso no hay competencia (UMMS, 2000). La presente tesis se encargará de demostrar si existe o no algún tipo de competencia entre *P. aeruginosa* y *Bacillus cereus*.

La simbiosis es un tipo de interacción biológica entre dos o más organismos de distintas especies. Tienen actividades o requerimientos en común, pueden interactuar en cierto grado; durante esa interacción es posible que se beneficien, dañen o se afecten a una o a ambas especies. La simbiosis se puede presentar como: mutualismo, comensalismo, parasitismo, antagonismo, neutralismo, entre otros (Osorio, 2006).

1.4.10.1. Mutualismo

Cuando dos o más microorganismos viven en un medio común, los participantes reciben un beneficio y su relación es esencial para ambos (Osorio, 2006). Si los organismos conservan la facultad de poder vivir en forma independiente, la relación se denomina *protocooperación* (un subtipo de *mutualismo*).

1.4.10.2. Comensalismo

Es la relación no permanente ni obligatoria que se establece entre dos especies diferentes de la que una sale netamente beneficiada mientras que para la segunda es una relación neutra o indiferente (Gottschalk, 1986).

1.4.10.3. Neutralismo

Es una relación biológica interespecífica en la cual ninguno de los individuos recibe beneficio ni perjuicio (Gottschalk, 1986).

1.4.10.4. Parasitismo

El parasitismo es una interacción biológica entre dos organismos, en la que uno de los organismos (el parásito) consigue la mayor parte del beneficio de una relación estrecha con otro, el huésped u hospedador. Es un proceso por el cual una especie amplía su capacidad de supervivencia utilizando a otras especies para que cubran sus necesidades básicas y vitales. La especie explotada (huésped) normalmente no obtiene un beneficio por los servicios prestados, y se ve generalmente perjudicada por la relación, viendo menoscabada su viabilidad (Ray, 2001).

1.4.10.5. Antagonismo

Los microorganismos presentes en un mismo medio pueden inhibirse entre si a través de diferentes mecanismos, que en algunos casos son letales. Este fenómeno se ha encontrado entre distintas bacterias, entre bacterias y levaduras, levaduras y mohos y entre bacterias y mohos. Los microorganismos ejercen su acción antagonista mediante diferentes productos metabólicos (Ray, 2001).

1.4.11. El Petróleo y su composición

El petróleo es un recurso no renovable y de las sustancias más valiosas de las que podemos disponer. Es una sustancia aceitosa de color oscuro que se encuentra en el interior de la tierra y se compone principalmente de carbono e hidrógeno; lo que significa que es un hidrocarburo y no un mineral, ya que procede de sustancias orgánicas (Téllez & Valderrama, 2000). Es un líquido insoluble en agua y de densidad entre 0.75 y 0.95 g/mL. La composición media de este hidrocarburo es 85% C, 12% H y 3% S, O, N, además de varios elementos metálicos. Su composición química y sus propiedades físicas varían según su origen. Está compuesto mayoritariamente por alcanos de cadena lineal (*n*-alcanos o *n*parafinas), alcanos ramificados (en menor cantidad), cicloalcanos y cantidades variables de hidrocarburos aromáticos (Fernández *et al.*, 1992).

Dependiendo del número de átomos de carbono y de la estructura de los hidrocarburos que integran el petróleo, se tienen diferentes propiedades que los caracterizan y determinan su comportamiento como combustibles, lubricantes, ceras o solventes (Bossert & Bartha, 2003). Las cadenas lineales de carbono asociadas a hidrógeno, constituyen las parafinas; cuando las cadenas son ramificadas se tienen las isoparafinas; al presentarse dobles uniones entre los átomos de carbono se forman las olefinas; las moléculas en las que se forman ciclos de carbono son los naftenos, y cuando estos ciclos presentan dobles uniones alternas (anillo bencénico) se tiene la familia de los aromáticos (Fernández *et al.*, 1992).

1.4.11.1. Compuestos derivados del petróleo

- a. Gas natural: Está constituido por metano con proporciones variables de otros hidrocarburos (etano, propano, butanos, pentanos y gasolina natural) y de contaminantes diversos. Representa aproximadamente el 47 % de los combustibles utilizados en el país (Atlas, 1991).
- b. Gasolina: es un producto del petróleo de mayor demanda. Es una combinación de diferentes hidrocarburos alifáticos, alifáticos ramificados, aromáticos y compuestos cíclicos de entre cinco a doce átomos de carbono. Estas fracciones son muy livianas ($d= 0,75$ g/mL), volátiles y polares. Se emplea en los automóviles, aviones y diversos equipos (Atlas, 1991).
- c. Queroseno: es un combustible líquido liviano y volátil derivado del petróleo. Antes se utilizaba para iluminación, pero actualmente se utiliza como combustible para la cocina, calentadores y otros (Atlas, 1991).
- d. Asfalto: se obtiene como residuo de la refinación del petróleo crudo. Sirve principalmente para la pavimentación y techado (Atlas, 1991).
- e. Combustible diesel: es un líquido polar, volátil, cuya densidad se encuentra en 0,9 g/mL. Está compuesto por hidrocarburos alifáticos, alifáticos ramificados, aromáticos y compuestos cíclicos de entre 10 a 25 átomos de carbono (Tabla 1.1). Se emplea para el uso de motores diesel como autobuses, tractores, camiones de carga, trailers, locomotoras y otros (Fernández *et al.*, 1992).

Tabla 1.1: Propiedades físicas, estructura química y usos de algunos derivados del petróleo (Fernández *et al.*, 1992).

Fracción	T° ebullición (°C)	Composición	Usos
Gasolina ligera	20-100	C ₅ H ₁₂ -C ₇ H ₁₆	Disolvente
Bencina	70-90	C ₆ -C ₇	Limpieza en seco
Ligroina	80-120	C ₆ -C ₈	Disolvente
Gasolina	20-180	C ₆ -C ₁₁	Carburante de motores
Queroseno, Jet fuel	200-300	C ₁₂ -C ₁₆	Alumbrado y carburante
Gasoil. Diesel	200-350	C ₁₃ -C ₁₈	Carburante de motores
Aceite lubricante	200-350	C ₁₆ -C ₂₀	Lubricantes
Grasas, vaselinas	250-400	C ₁₈ -C ₂₂	Farmacéutica
Cera de parafina	245-540	C ₂₀ -C ₄₅	Velas
Betún asfáltico (35% peso)	>540	C ₃₀ -C ₄₅	Alquitrán asfáltico coque de petróleo

1.4.12. Contaminantes del suelo

Los contaminantes del suelo se pueden clasificar en tres grupos (Baker, 1994):

- a. Biológicos: Incluyen bacterias, protozoarios, nemátodos y hongos.
- b. Físicos: Principalmente sustancias radiactivas provenientes de descargas de desechos radiactivos, desechos nucleares o explosivos.
- c. Químicos: Incluyen todo tipo de sustancias que provienen de residuos sólidos industriales, plaguicidas, metales pesados y derivados del petróleo.

1.4.13. Fuentes de contaminación de suelos

Las principales fuentes de contaminación del suelo se pueden clasificar en (Baker, 1994):

- a. Zona urbana: Tiraderos de basura, fugas de alcantarillado, derrames accidentales.

- b. Rural: Uso de plaguicidas, descargas de letrinas, criaderos de animales, uso excesivo de fertilizantes, canales de aguas residuales.
- c. Industrial: Derrames de combustibles, descargas de aguas residuales, ruptura de tanques y tuberías, disposición de desechos sólidos.

1.4.14. Presencia de hidrocarburos en el suelo

El manejo inadecuado de los materiales y residuos peligrosos ha generado a escala mundial, un problema de contaminación de suelos, aire y agua (Restrepo, 2002).

Los derrames de petróleo son accidentes que eventualmente ocurren por fallas humanas, por problemas de mantenimiento de los equipos o de los sistemas, por roturas de tuberías, entre otros.

A nivel mundial los incidentes de petróleo superan los 8.8 millones de toneladas métricas por año (Domínguez & García, 1999). En el caso de Ecuador, se puede decir que la contaminación a gran escala comenzó con la modernización del Estado a partir de la primera Reforma Agraria en 1963, y que se afianzó con el auge petrolero a partir de la década de 1970 (Restrepo, 2002). Más de 650.000 barriles de crudo han sido derramados en bosques, ríos y esteros. Varias etnias indígenas, como los Cofanes, Sionas y Secoyas, han sido afectadas hasta convertirse en minorías en peligro de desaparición (Restrepo, 2002).

En el suelo, los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos. Dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo; la cantidad vertida puede ser más o menos lenta, lo que ocasiona una mayor toxicidad y por tanto una mayor contaminación (Atlas & Bartha, 2002).

Los tratamientos físicos y/o químicos utilizados para favorecer la remediación de los ambientes contaminados pueden ocasionar un mayor impacto ecológico que el

mismo derrame, debido a la toxicidad y recalcitrancia de las sustancias químicas que usan (Bonilla *et al.*, 1999). Por esta razón una excelente alternativa es la biorremediación, proceso que consisten en el uso de organismos como plantas, hongos, bacterias naturales o modificadas genéticamente, para neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas en compuestos con menor impacto ambiental o convirtiéndolos en inocuos para la salud humana (Téllez & Valderrama, 2000). En la biodegradación de hidrocarburos, las bacterias de mayor uso y mayor capacidad degradativa son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia rubidae* y *Bacillus cereus*. Estas bacterias sobresalen de las demás por su extraordinaria capacidad de adaptación, ya que viven en ambientes muy diversos y extremos (Ruales, 2005). Aunque también se han empleado otros microorganismos como hongos, algas, cianobacterias y actinomicetes para la degradación de compuestos tóxicos en el suelo.

La biorremediación del suelo, puede ser dividida en estrategias *in situ* y *ex situ* (Kaplan, 2004). *In situ* corresponde a la biorremediación referente a tratamientos que no requieren excavación del suelo contaminado; *ex situ* es un método donde se excava el suelo o el material a tratar y se lo maneja en un sistema controlado (Bonilla, 1999). La biorremediación *in situ* es la más aplicada y utiliza microorganismos autóctonos, estos en el suelo pueden degradar un gran número de constituyentes pero su eficacia puede aumentar añadiéndose nutrientes, agua, oxígeno y microorganismos afines, estos últimos son especializados en metabolizar hidrocarburos puesto que adquieren una gran tolerancia a su toxicidad (De Lorenzo, 2002).

1.4.15. Consecuencias ambientales, sociales y económicas ocasionadas por derrames petroleros

En el Ecuador, el transporte de crudo y sus derivados se ha visto afectado considerablemente durante los últimos 35 años, por una permanente actividad terrorista contra los oleoductos e instalaciones petroleras. Desde 1972, compañías internacionales en colaboración con Petroecuador, han extraído millones de barriles de petróleo de la Amazonía ecuatoriana. Durante este proceso, se calcula que se han derramado en el medio ambiente millones de galones de sustancias tóxicas, gas y petróleo (Restrepo, 2002).

Se estima que se han invertido aproximadamente 80 millones de dólares en remediar terrenos con crudo de petróleo. Cuando existe un derrame petrolero, la empresa aseguradora asume los gastos siempre y cuando supere los dos millones y medio; sino la petrolera cubre los gastos. En los últimos 5 años Petroecuador ha invertido cerca de 80 millones de dólares para tratar suelos o acuíferos contaminados, usando métodos químicos o físicos; sin embargo Petroamazonas ha sido la empresa precursora en usar la técnica de Biorremediación. Un procedimiento económico y con soluciones amigables para el medio ambiente (Domínguez & García, 1999).

Cuando los hidrocarburos llegan al agua, la mancha generada por estos vertidos flota por diferencia de densidades impidiendo la entrada de luz y el intercambio gaseoso, dando comienzo a la solubilización de compuestos hidrosolubles y a la afección de diferentes poblaciones: la primera población afectada por un derrame es el plancton, en segundo lugar son afectados los macroinvertebrados, y la última población afectada son los Bentos o población de macroinvertebrados que viven en los fondos de los ríos y ciénagas (Domínguez & García, 1999).

Diferentes estudios han determinado el efecto de la contaminación con hidrocarburos en la germinación y crecimiento vegetativo de diferentes especies de pastos sometidos a diferentes concentraciones de hidrocarburo, concluyendo que hay una inhibición en la germinación del trébol común y un marcado retraso en el crecimiento de todas las plantas evaluadas. La mayoría de estas sustancias tienen la propiedad de bioacumularse, es decir que estos compuestos nocivos se depositan en los tejidos vivos y de esa manera llegan al ser humano (Domínguez y García 1999).

La explotación petrolera en el norte de la Amazonía ecuatoriana es responsable de la deforestación de 2 millones de hectáreas. Más de 650.000 barriles de crudo han sido derramados en bosques, ríos y esteros. Sustancias tóxicas, producto de la explotación petrolera, como los metales pesados provenientes de las aguas de formación, han contaminado las fuentes de agua de la región (Ruales, 2005). Varias etnias indígenas, como los Cofanes, Sionas y Secoyas, han sido afectadas hasta convertirse en minorías en peligro de desaparición (Restrepo, 2002).

Estudios realizados en el 2003 por la Organización Mundial de la Salud muestran que la exposición de las poblaciones nativas, a la contaminación petrolera produce efectos adversos sobre la salud. Las consecuencias que se atribuyen a la exposición al petróleo incluyen cánceres (esófago, faringe, piel, leucemia entre otros), abortos espontáneos, dermatitis, cefaleas, y varios otros síntomas (OMS, 2003).

Por medio de la Biorremediación se podrán recuperar varias extensiones de terrenos y acuíferos que contienen petróleo (Ruales, 2005). Este estudio es la pauta para que a nivel de laboratorio, se puedan adaptar bacterias para que consuman un mismo alimento que contenga hidrocarburos y poco a poco ir escalando a volúmenes grandes, de tal manera que el medio ambiente en un corto plazo se pueda ir saneando.

1.5. Hipótesis

1.5.1. El medio mineral con gasolina-extra estimulará, en el menor tiempo posible, un buen crecimiento del consorcio de bacterias específicas y especializadas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*) en la degradación de hidrocarburos presentes en suelos contaminados por petróleo.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

La investigación se realizó previa a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología, otorgado por la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, mediante convenio de la Escuela Politécnica del Ejército y Petroecuador, por medio del cual se tuvo acceso a diferentes proyectos realizados por Petroamazonas y Qmax-Ecuador; quienes han investigado y aislado de sus suelos las bacterias con mejor capacidad degradativa capaces de sobrevivir en tolueno, diesel, gasolina-extra, degresol y hexano. De igual manera esta misma empresa desarrollo la formulación del medio de cultivo mineral, donde se realizó la adaptación independiente de *P. aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Serratia rubidea* enriquecido con tolueno al 1% .

La alumna responsable de la ejecución de la tesis fue la señorita María Daniela Córdoba Pizarro, egresada de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Los profesionales que asesoraron el trabajo fueron, por parte de ESPE, la M.Sc. Alma Koch Kaiser y la Ing. Patricia Moreira y por parte de Qmax-Ecuador, el Bioquímico Mauricio Ruales.

2.2. Zona de estudio

El estudio fue ejecutado en su mayor parte en los Laboratorios de Biorremediación de la Petrolera Petroamazonas S.A., ubicados en el Bosque Húmedo Tropical, entre las provincia de Orellana y Sucumbíos, ciudad Limoncocha. Los estudios finales de medición bacteriana fueron realizados en los Laboratorios de Microbiología de la Facultad de Ingeniería en Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército, ubicados en Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.

2.3. Período de inicio de la investigación

La presente investigación fue iniciada en el mes de marzo del año 2008 culminando en el mes de diciembre del año 2008.

2.4. Diseño Experimental

El diseño experimental para la determinación de la fuente de carbono y cinética bacteriana óptima, se fundamentó en un diseño completamente al azar (Kuehl, 2001) donde se aplicaron cinco tratamientos y cuatro repeticiones en cada uno de ellos.

Las condiciones en todos los tratamientos fueron homogéneas. El formulado del medio mineral desarrollado por Qmax fue probado con diferentes fuentes de carbono. Se midió a cada hora la absorbancia (longitud de onda de 540 nm) de las muestras bacterianas: durante un período de 24 horas para el tratamiento testigo, diesel y gasolina-extra; y por un tiempo de 72 horas para tolueno y hexano. Los datos obtenidos fueron ingresados a un programa estadístico SAS (SAS, 1998) y se realizó el análisis de variancia y la prueba de significancia.

2.5. Procedimientos

2.5.1. Determinación de la pureza bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*.

Las cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* provinieron de los Laboratorios Qmax Ecuador, empresa que se encargó de realizar estudios y trabajos de biorremediación. Se aislaron estas bacterias de suelos provenientes de Petroamazonas S.A. (Unidad-Bloque 15). Debido a que estas muestras bacterianas no procedieron de cultivos certificados, se realizó una identificación diferencial macroscópica, microscópica y claves de identificación de género y especie bacterianas. (Ruales, 2005).

2.5.1.1 Identificación macroscópica bacteriana

La identificación macroscópica consistió en la determinación de las características morfológicas de las colonias. Para esto se sembró a cada bacteria, en el medio de cultivo Agar Nutriente, se utilizó la técnica de zig-zag y se las dejó incubar a 35°C durante 24 horas (Bergey, 1994). Finalizado este tiempo de incubación, se evaluaron las siguientes características (tabla 2.1): color de la colonia, color del medio; margen, elevación y tamaño de la colonia (Todar, 2000). Luego de realizar el análisis general de las bacterias, se tomó con el asa bacteriológica una muestra de cada una de ellas y se las sembró en los medios de cultivo selectivos, como Agar *Bacillus cereus* (Buesa, 1981) y Agar Cetrimide (Baltch &Smith, 1994); mediante la técnica de estría simple, por un período de 24 horas a una temperatura de 35°C. En estos medios se evaluó si hubo o no crecimiento bacteriano, el color de la colonia y color del medio de cultivo.

Tabla 2.1: Operacionabilidad de las variables dependientes e independientes en el análisis macroscópico.

Variable Dependiente	Variable Independiente	Indicador
Bacterias	Color colonia	Beige/amarillo/rosa/verde
	Margen	Entero/ondulado/lobulado/filamentoso/ondeado
	Elevación	Plano/elevado/convexo/pulvinado/umbonado
	Tamaño	Milímetros
	Tinción bacteria	Positiva/Negativa
	Forma bacteria	Bacilo/coco
	Presencia esporas	Sí/No
Medio Cultivo	Color medio	Beige/rojo/verde

2.5.1.2. Identificación microscópica bacteriana

La identificación microscópica (microscopio óptico) se basó en el método de tinción Gram (Reynolds, 2005).

Se realizó un frotis con agua destilada del cultivo a analizar y se fijó con calor, el frotis fijado se lo tiñó con Violeta Cristal (1 minuto), se lavó con agua, se cubrió con solución Yodada (1 minuto) y se lavó nuevamente con agua, se decoloró con una mezcla etanol/acetona. Se escurrió y cubrió con Safranina (color de contraste) durante 20 segundos. Se hizo el lavado con agua y se dejó secar cerca del mechero (Reynolds, 2005).

Las placas fueron observadas en el microscopio óptico en el lente de 100x con aceite de inmersión. Las variables a evaluar fueron (tabla 2.2): color de las bacterias (gram positivos/negativos), forma de las bacterias y presencia o ausencia de esporas (Rodríguez, 2001).

Tabla 2.2: Operacionabilidad de las variables dependientes e independientes en el análisis microscópico.

Variable Dependiente	Variable Independiente	Indicador
Bacterias	Tinción bacteria	Positiva/Negativa
	Forma bacteria	Bacilo/coco
	Presencia esporas	

2.5.1.3. Identificación de género y especie. Claves de identificación-Sistema API

Para determinar el género y especie de las bacterias se realizaron pruebas bioquímicas mediante el uso del Sistema API que es un método manual miniaturizado que permitió la identificación estandarizada de las bacterias en género y especie (Prescott, 2004).

2.5.1.3.1 API 50 CH para *Bacillus cereus*

El API 50 CH es un sistema estandarizado compuesto por 50 ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo de los hidratos de carbono en los microorganismos (Biomérieux, 2005). Durante el período de incubación, la fermentación se traduce en un cambio de color en el tubo, debido a la producción de ácido en anaerobiosis (Figura 2.1).



Figura 2.1: Sistema de galerías API 50CH (Biomérieux, 2005).

- **Preparación de las galerías**

Cada galería está constituida por cinco filas conteniendo cada una 10 tubos numerados. Se prepara la cámara de incubación y se anota la referencia de las cepas. Se reparten 10 mL de agua destilada en los alvéolos del fondo para crear una atmósfera húmeda. Se coloca encima de los alvéolos las galerías (Biomérieux, 2005).

- **Inoculación de las galerías**

En un tubo con 5 mL se realiza una suspensión bacteriana con una cantidad de 10^9 bacterias/mL, y se homogeniza la muestra. A partir de esta suspensión y con ayuda de una pipeta se introduce el inóculo en los 50 tubos de la galería. Se incuban las galerías a la temperatura óptima de crecimiento 35°C (Baltch & Smith, 1994); (Buesa, 1981). La lectura de las galerías se realiza con tiempos de incubación definidos de 24 y 48 horas (Biomérieux, 2005).

2.5.1.3.2 API 20E para *Pseudomonas aeruginosa*

El API 20E es un sistema estandarizado compuesto por 20 ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo de los hidratos de carbono en los microorganismos. Durante el período de incubación, la fermentación se traduce en un cambio de color en el tubo, debido a la producción de ácido en anaerobiosis (figura 2.2).



Figura 2.2: Galerías de pruebas Bioquímicas API 20CH (Biomérieux, 2005).

- **Preparación de las galerías**

Se prepara la cámara de incubación y se anota la referencia de las cepas. Se reparten 5 mL de agua destilada en los alvéolos del fondo para crear una atmósfera húmeda. Se colocan las galerías encima de los alvéolos (Biomérieux, 2005).

- **Inoculación de las galerías**

En un tubo con 5 mL se realiza una suspensión bacteriana con una cantidad de 10^9 bacterias/mL y se homogeniza la muestra. A partir de esta suspensión y con ayuda de una pipeta se introduce el inóculo en los tubos de la galería. Para las pruebas de CIT, VP y GEL se deben llenar los tubos y las cúpulas. Para las pruebas: ADH, LDC, ODC, H₂S, URE se tiene que crear una atmósfera anaerobia llenando la cúpula con aceite de parafina. Para las otras pruebas se debe llenar únicamente los tubos más no las cúpulas (Biomérieux, 2005). Se incuban las galerías a la temperatura óptima de crecimiento 35°C (Baltch & Smith, 1994); (Buesa, 1981). La lectura de las galerías se realiza con tiempos de incubación definidos de 24 y 48 horas (Biomérieux, 2005).

2.6. Pruebas de antagonismo entre *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*

Se realizaron pruebas de antagonismo, con diferentes combinaciones entre las dos bacterias y se comprobó si existió o no el crecimiento de colonias bacterianas en agar nutriente a 35°C por 24 horas (Collins *et al.*, 1999; Umbreit, 1982).

Para esto se utilizaron dos métodos:

1.- Placa de agar con discos de papel:

Se colocó en todo el medio de cultivo Agar Nutriente la primera bacteria en dilución, por ejemplo *P. aeruginosa*, se la dejó secar y posteriormente se colocaron dos papeles con la segunda bacteria *B. cereus* (Collins *et al.*, 1999). Se incubó la muestra a 35°C durante 24 horas (Figura 2.3); (Cuadro 2.1).

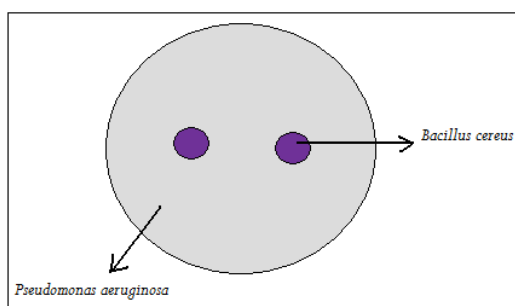


Figura 2.3: Placa de agar con discos de papel (Collins *et al.*, 1999)

Cuadro 2.1: Determinación del crecimiento de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* mediante la técnica Placa de agar con discos de papel.

# PRUEBA	COMBINACIONES	CRECIMIENTO
1	<i>P.aeruginosa</i> (agar) vs. <i>B. cereus</i> (papel)	Sí / No
2	<i>P.aeruginosa</i> (papel) vs. <i>B. cereus</i> (agar)	Sí / No

2.- Método de los pozos por halos de inhibición:

Mediante la técnica de Umbreit (1982) se colocó en todo el medio de cultivo Agar Nutriente la primera bacteria en dilución, por ejemplo *B. cereus*, se la dejó secar y posteriormente se hicieron dos pocillos con la segunda bacteria *P. aeruginosa* (Figura 2.4). Se dejó incubar a una temperatura de 35°C por 24 horas (Cuadro 2.2).

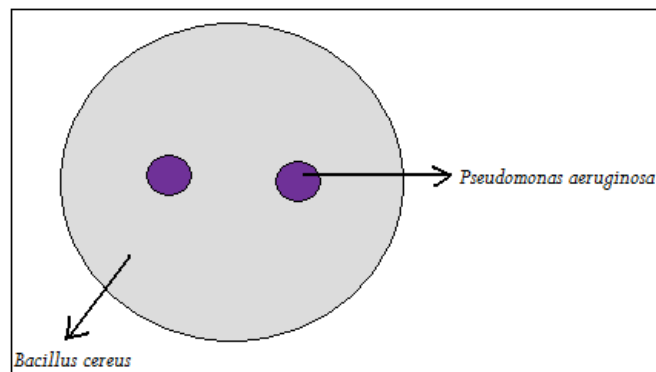


Figura 2.4: Método de los pozos por halos de inhibición (Umbreit, 1982).

Cuadro 2.2: Determinación del crecimiento de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* mediante la técnica Método de los pozos por halos de inhibición.

# PRUEBA	COMBINACIONES	CRECIMIENTO
1	<i>P.aeruginosa</i> (agar) vs. <i>B. cereus</i> (pozo)	Sí / No
2	<i>P.aeruginosa</i> (pozo) vs. <i>B. cereus</i> (agar)	Sí / No

2.7. Determinación de la Fuente de Carbono y Cinética Bacteriana Óptimas

Para la obtención de la fuente de carbono óptima, en el Medio Mínimo Mineral (caldo), se realizó un diseño completamente al azar (DCA), con el uso de cuatro (4) tratamientos y un tratamiento control (tabla 2.3). En cada uno de los tratamientos se realizaron cuatro (4) repeticiones.

Las hipótesis nula (H_0) y alterna (H_a) planteadas fueron:

$$\text{Tratamientos : } \left\{ \begin{array}{l} H_0: t_1=t_2=t_3=t_4=t_5=t_6=t_7=t_8=t_9=t_{10}=t_{11}=t_{12}=t_{13}=t_{14}\dots t_n \\ H_a: t_1\neq t_2\neq t_3\neq t_4\neq t_5\neq t_6\neq t_7\neq t_8\neq t_9\neq t_{10}\neq t_{11}\neq t_{12}\neq t_{13}\neq t_{14}\dots t_n \end{array} \right.$$

Tabla 2.3: Determinación de la absorbancia en cada uno de los tratamientos con diferentes fuentes de carbono, mediante el uso del Espectrofotómetro.

REPETICIONES	TRATAMIENTOS				
	A	B	C	D	E
1					
2					
3					
4					
A: Medio Mineral sin fuente de Carbono					
B: Medio Mineral con Tolueno 1%					
C: Medio Mineral con Hexano 1%					
D: Medio Mineral con Gasolina-extra 1%					
E: Medio Mineral con Diesel 1%					

El Medio Mínimo Mineral desarrollado por la empresa Qmax, fue preparado con la siguiente formulación para 1 Litro (tabla 2.4) (Ruales, 2006):

Tabla 2.4: Formulación del Medio Mínimo Mineral. (Ruales, 2006)

Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	9.0	g
KH ₂ PO ₄	1.5	g
NH ₄ Cl	2.0	g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0.2	g
Citrato férrico de amonio	5.0	mg
MnSO ₄ .H ₂ O	3.0	mg
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0.2	mg
CoSO ₄	10.0	µg
Acido Nitrotriacético (NTA)	10.0	mg
Agua destilada	1000.0	mL

Las bacterias fueron activadas en caldo nutritivo por 24 horas a una temperatura de incubación de 35°C (Ruales, 2005). Después de este tiempo se aplicó la técnica de Brock (1999) donde se tomó un mililitro (1 mL) de caldo bacteriano (aproximadamente 10⁹ bacterias/mL) y se diluyó en nueve mililitros (9 mL) de agua destilada (-1; ~10⁸ bacterias/mL), de esta dilución se tomó un mililitro (1 mL) y se colocó en nueve mililitros (9 mL) de agua destilada (-2; ~10⁷ bacterias/mL) y se repitió este procedimiento hasta llegar a la dilución (-4; ~10⁶ bacterias/mL). De esta última dilución bacteriana, se tomó un mililitro (1 mL) y se colocó en cincuenta mililitros (50 mL) de medio Mineral con las diferentes fuentes de carbono (tolueno 1%, diesel 1%, hexano 1% y gasolina-extra 1%); más un tratamiento control o testigo que no tuvo fuente de carbono. Cada uno de estos tratamientos tuvo cuatro (4) repeticiones y se los dejó incubar por 24 horas a una temperatura de 35°C (Ruales, 2006). Se midió la absorbancia de cada tratamiento en el espectrofotómetro (Anexo C, D), cada hora durante un período de 24 horas y se comprobó que el crecimiento bacteriano sea de escala McFarland 2 (300 millones/mL). El medio que presentó la mayor absorbancia y por tanto el mejor crecimiento bacteriano fue el seleccionado.

Los datos obtenidos de absorbancia se los relacionó con el número de bacterias por mililitro (Brown, 2007), se realizó un análisis de varianza y se pudo comparar las diferentes curvas: Absorbancia vs. Tiempo y Número de bacterias vs. Tiempo. Las pruebas de cinética bacteriana nos van a permitir determinar que fuente de carbono es la óptima para el conglomerado de bacterias.

2.7.1. Medición de la absorbancia para los tratamientos con diesel, gasolina-extra y sin fuente de carbono

Los tratamientos con gasolina-extra, diesel y sin fuente de carbono (tratamiento testigo); fueron medidos durante un tiempo de 24 horas, puesto que durante este período el crecimiento exponencial de las bacterias llegó a su punto máximo y comenzó a decaer entrando a la fase de muerte. Se realizaron cuatro repeticiones de cada uno de los tratamientos y se realizó el análisis del ADEVA, calculándose las medias, mediana, varianza, grados de libertad, valor de F, etc. A partir de los promedios se realizó la relación que existe entre absorbancia y concentración bacteriana, para de esta manera tener una idea numérica de la cantidad de bacterias que hubo en el crecimiento exponencial.

2.7.2. Medición de la absorbancia para los tratamientos con tolueno y hexano

Para los tratamientos de hexano y tolueno, inicialmente se tomaron las absorbancias durante 24 horas, sin embargo los valores no variaban. Después de este período, se tomaron las absorbancias cada 8 horas hasta que al tercer día, es decir a partir de las 48 horas hubo variación en el crecimiento bacteriano y se tomaron los datos cada hora. Por lo tanto a partir del día tercero empezó el crecimiento cinético bacteriano y las mediciones fueron tomadas cada hora durante un período de 24 horas, hasta que las bacterias empezaron a entrar a la fase de muerte.

2.8. Análisis estadístico

Los datos de absorbancia obtenidos fueron ingresados en un programa estadístico SAS (SAS, 1998) con el que se realizaron los análisis de variancia de los diferentes tratamientos de carbono. A partir de las medias de cada tratamiento se realizaron las gráficas que muestran el crecimiento cinético bacteriano y las fases de crecimiento: desde la fase latencia hasta la fase de muerte.

El diseño estadístico que se empleó fue el diseño completamente al azar (DCA). Es el más usado y donde se obtienen resultados eficientes para investigaciones en laboratorio, invernadero o en establos en condiciones controladas (Steel, R. & J. Torrie., 1988). Se usa cuando el material experimental y el sitio donde se va a realizar la investigación, son homogéneos o existe una escasa variabilidad, la misma que se encuentra uniformemente repartida en todos los tratamientos (Zamudio S. *et al.*, 1996).

En base a este diseño se realizó el análisis del ADEVA y la prueba de significancia de Tuckey, que es un procedimiento estadístico que sirve para determinar rangos de clasificación, es decir, categorizaciones entre los promedios de tratamientos que estamos evaluando. Esta prueba se usa cuando hay más de dos tratamientos y se conoce como “prueba honesta”.

Para esta prueba es necesario ordenar los promedios de los tratamientos en forma ascendente o descendente. Luego realizar todas las posibles combinaciones entre los tratamientos y establecer las diferencias entre ellos. Mediante la formula se establece la prueba de significancia entre los tratamientos.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. Determinación de la pureza bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*.

3.1.1. Identificación macroscópica general y selectiva de las bacterias.

Una vez finalizado el tiempo de incubación de las bacterias (*P. aeruginosa* y *Bacillus cereus*), provenientes del medio de cultivo general Agar Nutriente (Cuadro 3.1), se obtuvieron las siguientes características macroscópicas enumeradas a continuación:

Cuadro 3.1: Características macroscópicas de *Bacillus cereus* y *P. aeruginosa* en Agar Nutriente a las 24 horas de incubación a 35°C.

Bacteria	Características Macroscópicas	
<i>Bacillus cereus</i>	Color colonia:	beige opaco
	Forma:	irregular-filamentosa
	Tamaño:	6-8 mm
	Superficie:	Rugosa
	Elevación:	Aplanada
	Borde:	Lobulado
	Consistencia:	Viscosa
	Color medio:	amarillo transparente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Color colonia:	beige brillante
	Forma:	Circular
	Tamaño:	1-2mm
	Superficie:	Lisa
	Elevación:	Convexa
	Borde:	Entero
	Consistencia:	Mucosa
	Color medio:	Verde

En la Figura 3.1 se puede apreciar el crecimiento de *Bacillus cereus* en el medio de cultivo agar nutriente. La bacteria fue sembrada en caja petri durante un período de 24 horas a una temperatura de 35°C. El color de la colonia pura es beige opaco, con forma irregular y tamaño de entre 6-8 mm.

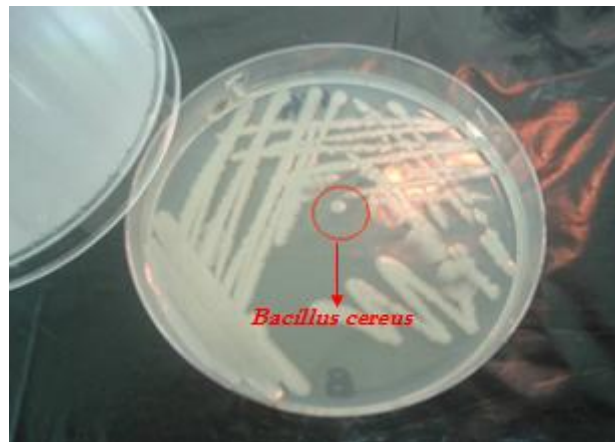


Figura 3.1: Vista macroscópica en caja petri del crecimiento de *Bacillus cereus* en Agar Nutriente durante un período de incubación de 24 horas a 35°C (Córdoba, 2008).

En la Figura 3.2 se puede observar el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en el medio de cultivo agar nutriente, este microorganismo fue sembrado en caja petri durante un período de 24 horas a una temperatura de 35°C. El crecimiento de la colonia pura es circular liso, de color beige brillante.



Figura 3.2: Vista macroscópica en caja petri del crecimiento de *P. aeruginosa* en Agar Nutriente durante un período de incubación de 24 horas a 35°C (Córdoba, 2008).

En la Figura 3.3 se puede ver el cambio de color del medio de cultivo Agar Nutriente, este cambia de amarillo a verde (Figura 3.3) por acción de sus pigmentos como piocianina y fluoresceína.

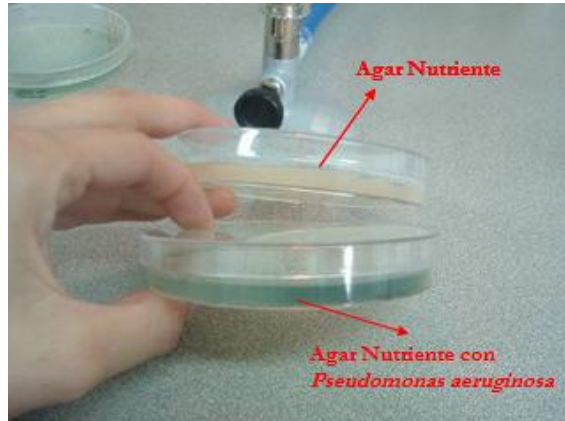


Figura 3.3: Comparación entre el crecimiento en caja petri de los medios de cultivo agar nutriente sin inóculo y agar nutriente con *Pseudomonas aeruginosa* (Córdoba, 2008).

Del medio de cultivo Agar Nutriente se tomó una muestra bacteriana y al inóculo se lo sembró en los medios de cultivo selectivos. Los resultados de las características macroscópicas (Cuadro 3.2), obtenidas a partir de los medios: Agar cetrimide (*Pseudomonas aeruginosa*) y Agar Bacillus cereus (*Bacillus cereus*) se los presenta a continuación:

Cuadro 3.2: Características macroscópicas de *Bacillus cereus* y *P. aeruginosa* en los medios de cultivo selectivos. Agar cetrimide (*Pseudomonas aeruginosa*) y Agar Bacillus cereus (*Bacillus cereus*) a las 24 horas de incubación a 35°C.

Bacteria	Características Macroscópicas	
<i>Bacillus cereus</i>	Crecimiento bacteriano: Sí	
	Color colonia:	beige
	Color medio:	Rojo-tomate
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Crecimiento bacteriano: Sí	
	Color colonia:	verde brillante
	Color medio:	amarillo-verde

En la Figura 3.4 se puede apreciar el crecimiento de *Bacillus cereus* en el medio de cultivo selectivo Agar Bacillus cereus. La bacteria cambió el color del medio de cultivo de rojo a tomate y a lo largo de la estría de crecimiento se forma un precipitado de color rojo por acción de la enzima lecitinasa.

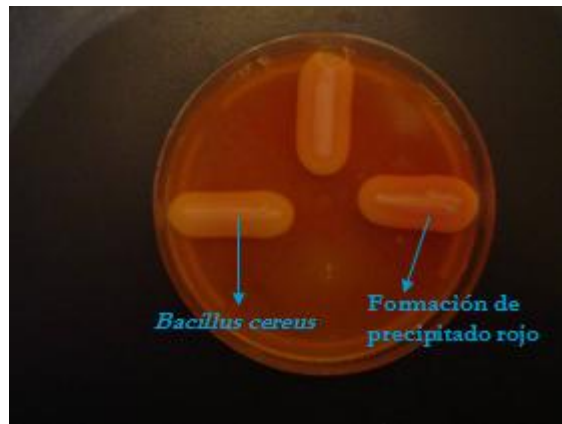


Figura 3.4: Vista macroscópica en caja petri del crecimiento de *B. cereus* en Agar Bacillus cereus durante un período de incubación de 24 horas a 35°C (Córdoba, 2008).

En la Figura 3.5 se puede observar el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en el medio de cultivo Cetrimide, esta bacteria fue sembrada en caja petri durante un período de 24 horas a una temperatura de 35°C. Se dio un cambio del medio de cultivo amarillo a verde brillante con formación de colonias puras verde brillantes.

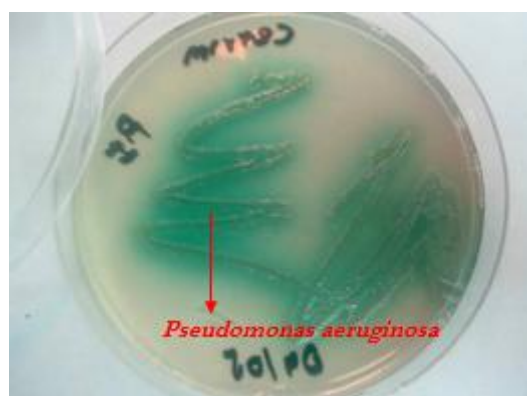


Figura 3.5: Vista macroscópica en caja petri del crecimiento de *P. aeruginosa* en Agar Cetrimide durante un período de incubación de 24 horas a 35°C (Córdoba, 2008).

3.1.2. Determinación microscópica de *Pseudomonas aeruginosa* y *B. cereus*.

La tinción gram se realizó a partir de las muestras bacterianas que se tomaron de los medios de cultivo selectivos Agar Cetrimide y Agar Bacillus Cereus (Cuadro 3.3). Mediante la técnica de Reynolds (2005) se pudo observar, a través del microscopio óptico 100X, las siguientes características microscópicas de *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Cuadro 3.3: Características microscópicas de *Bacillus cereus* y *P. aeruginosa* por medio del microscopio óptico en lente de inmersión de 100X. A las 24 horas de incubación a 35°C.

Bacteria	Características Microscópicas	
<i>Bacillus cereus</i>	Tinción gram:	Positiva
	Color bacteria:	Morada
	Forma:	Bacilo
	Presencia de esporas:	positiva
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tinción gram:	Negativa
	Color bacteria:	Roja
	Forma:	coco-bacilo
	Presencia de esporas:	negativa

En la Figura 3.6 se puede observar, por medio del microscopio óptico (100X) que *Bacillus cereus* es un bacillo gram positivos, de color morado con esporas.

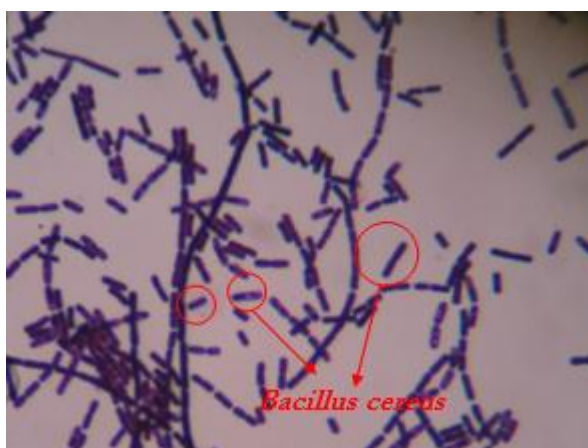


Figura 3.6: Vista de *Bacillus cereus* a través del microscopio óptico con aceite de inmersión a 100X (Córdoba, 2008).

En la Figura 3.7 se puede ver, por medio del microscopio óptico (100X) que *Pseudomonas aeruginosa* es un coco-bacilo de color rojo, gram negativo.



Figura 3.7: Vista de *Pseudomonas aeruginosa* a través del microscopio óptico con aceite de inmersión a 100X (Córdoba, 2008).

3.1.3. Pruebas de identificación de género y especie de *P. aeruginosa* y *Bacillus cereus*.

Una vez inoculadas las muestras bacterianas en cada una de sus galerías bioquímicas, después de 24 y 48 horas de incubación, los resultados obtenidos de las bacterias *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa* se presentan a continuación a través de las siguientes tablas.

En la figurar 3.8 se pueden apreciar las galerías de pruebas de identificación API para *Bacillus cereus*, después de 48 horas hubo cambio de color de rojo a amarillo o negro, lo que demuestra que algunas de las reacciones fueron positivas.



Figura 3.8: Galería de pruebas bioquímicas API 50CH para *Bacillus cereus*, después de 48 horas de incubación a 35°C (Córdoba, 2008).

En la figura 3.9 se pueden observar las galerías de pruebas de identificación API para *Pseudomonas aeruginosa*, después de 48 horas hubo cambios de color de amarillo a rosado, azul o negro; lo que demuestra que algunas de las reacciones fueron positivas. De esta manera se comprobó el género y especie de la bacteria.



Figura 3.9: Galería de pruebas bioquímicas API 20E para *Pseudomonas aeruginosa*, después de 48 horas de incubación a 35°C (Córdoba, 2008).

En las tablas presentadas a continuación se indican las reacciones positivas o negativas de estos microorganismos ante la presencia de diferentes carbohidratos. En la tabla 3.1 se pudo determinar que la bacteria entregada por la empresa Qmax fue *Bacillus cereus*.

Tabla 3.1: Resultados de identificación de género y especie (Sistema API 50CH) para *B.cereus* a 35°C después de 24 y 48 horas de incubación.

Sistema API 50CH para <i>Bacillus cereus</i>			Sistema API 50CH para <i>Bacillus cereus</i>		
Reactivos	Tiempo		Reactivos	Tiempo	
	24 horas	48 horas		24 horas	48 horas
Testigo	-	-	SAC	-	-
GLY	-	-	TRE	+	+
ERY	-	-	INU	-	-
DARA	-	-	MLZ	-	-
LARA	-	-	RAF	-	-
RIB	+	+	AMD	-	-
DXYL	-	-	GLYG	-	-
LXYL	-	-	XLT	-	-
ADO	-	-	GEN	-	-
MDX	-	-	TUR	-	-
GAL	-	-	LYX	-	-
GLU	+	+	TAG	-	-
FRU	v	+	DFUC	-	-
MNE	-	-	LFUC	-	-
SBE	-	-	DARL	-	-
RHA	-	-	LARL	-	-
DUL	-	-	GNT	v	+
INO	-	-	2KG	-	-
MAN	-	-	SAL	v	+
SOR	-	-	CEL	v	+
MDM	-	-	MAL	+	+
MDG	-	-	LAC	-	-
NAG	+	+	MEL	-	-
AMY	-	-			
ARB	v	+			
ESC	+	+			

v: resultado variable; positivo o negativo. Gly: glicerol; ERY:eritritol; DARA: D-arabinosa; LARA: L-arabinosa; RIB: D-ribosa; DXYL: D-xilosa; ADO: D-adonitol; MDX: metil-xilopiranosida; RHA: L-ramnosa; DUL: dulcitol; INO: inositol; GAL: D-galactosa; GLU: D-glucosa; FRU: D-fructosa; MNE: D-mamnosa; SBE: L-sorbosa; MAN: D-manitol; SOR: D-sorbitol; MDM: metil-manopiranosida; MDG: metil-glucopiranosida; NAG:N-acetil glucosamina; AMY: amigdalina; ARB: arbutina; ESC: esculina; SAL: salicina; CEL: D-celobiosa; MAL: D-maltosa; LAC: D-lactosa; MEL: D-melobiosa; SAC: D-sacarosa; CEL: D-celobiosa; MAL: D-maltosa; LAC: D-lactosa; MEL: D-melobiosa; SAC: D-sacarosa; TRE: D-trehalosa; INU: inulina; MLZ: D-melezitosa; RAF: D-rafinosa; AMD: almidón; GLYG: glicógeno; XLT: xilitol; GEN: gentiobiosa; TUR: D-turanosa; LYX: D-lixosa; TAG: D-tagatosa; DFUC: D-fucosa; LFUC: L-fucosa; DARL: D-arabitol; LARL: L-arabitol; GNT: Gluconato potásico; 2KG: 2cetoGluconato potásico; 5KG: 5cetoGluconato Potásico.

En la tabla 3.2 se pudo determinar que la bacteria entregada fue *Pseudomonas aeruginosa*, puesto que los resultados experimentales obtenidos en las claves de identificación son iguales a los teóricos. En la tabla presentada a continuación se indican las reacciones positivas o negativas de este microorganismo ante la presencia de diferentes carbohidratos.

Tabla 3.2: Resultados de identificación de género y especie (sistema API 20E) para *Pseudomonas aeruginosa* después de 24 y 48 horas de incubación a 35°C.

Sistema API 20E para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Reactivos	Tiempo	
	24 horas	48 horas
ONPG	-	-
ADH	+	+
LDC	-	-
ODC	-	-
CIT	+	+
H ₂ S	-	-
URE	v	+
TDA	-	-
IND	-	-
VP	-	-
GEL	+	+
GLU	+	+
MAN	-	-
INO	-	-
SOR	-	-
RHA	-	-
SAC	-	-
MEL	v	+
AMY	-	-
ARA	v	+
OX	+	+

v: resultado variable; positivo o negativo. ONPG: 2-nitrofenil-galactopiranosida; ADH: L-arginina; LDC: L-lisina; ODC: L-ornitina; CIT: citrato trisódico; H₂S: tiosulfato sódico; URE: urea; TDA: L-triptófano; IND: L-triptófano; VP: piruvato sódico; GEL: gelatina; GLU: D-glucosa; MAN: D-manitol; INO: inositol; SOR: D-sorbitol; RHA: L-ramnosa; SAC: D-sacarosa; MEL: D-melibiosa; AMY: amigdalina; ARA: L-arabinosa; OX: citocromo oxidasa.

3.2. Determinación de presencia o ausencia de antagonismo bacteriano entre *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*.

3.2.1. Placa de agar con discos de papel:

Una vez que las diferentes combinaciones entre *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa* se realizaron mediante la técnica de Collins (1999); e incubadas a 35°C por 24 horas; se presentaron los siguientes resultados.

En la figura 3.10 se puede observar el crecimiento de *P. aeruginosa* en el medio de cultivo (color verde). En los discos de papel se da el crecimiento de *Bacillus cereus*, sin que haya ningún tipo de inhibición entre ellas.

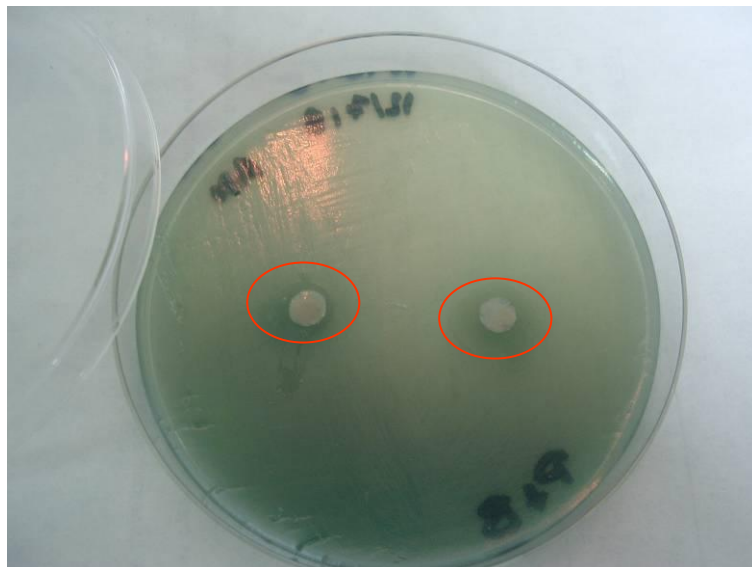


Figura 3.10: Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en todo el medio Agar Nutriente y crecimiento de *Bacillus cereus* en los discos de papel. Ausencia de halos de inhibición entre las bacterias (Córdoba, 2008).

El cuadro 3.4 indica las diferentes combinaciones entre *P. aeruginosa* y *Bacillus cereus* mediante la técnica de Collins (1999). Hubo crecimiento de cada una de las bacterias sin la formación de halos de inhibición.

Cuadro 3.4: Determinación del crecimiento de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* mediante la técnica Placa de agar con discos de papel, en agar nutriente por 24 horas a 35°C.

# PRUEBA	COMBINACIONES	CRECIMIENTO	HALOS DE INHIBICIÓN
1	<i>P.aeruginosa</i> (agar) vs. <i>B. cereus</i> (papel)	Sí	Ausencia
2	<i>P.aeruginosa</i> (papel) vs. <i>B. cereus</i> (agar)	Sí	Ausencia

3.2.2. Método de los pozos por halos de inhibición:

Los resultados obtenidos, para comprobar la presencia o ausencia de antagonismo entre *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*, mediante la segunda técnica de Umbreit (1982) se presentan a continuación.

En la figura 3.11 se puede ver el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en todo el medio de cultivo, incluso alrededor de los pozos de inhibición donde se encontraba *Bacillus cereus*. De igual manera esta última bacteria tuvo crecimiento en los pozos y su alrededor, no se observó ningún tipo de inhibición entre las bacterias.



Figura 3.11: Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en todo el medio Agar Nutriente y crecimiento de *Bacillus cereus* en los discos de papel. Ausencia de halos de inhibición entre las bacterias (Córdoba, 2008).

El cuadro 3.5 indica las diferentes combinaciones entre *P. aeruginosa* y *Bacillus cereus* mediante la técnica de pozos por halos de inhibición. Hubo crecimiento independiente de cada una de las bacterias sin la formación de halos de inhibición.

Cuadro 3.5: Determinación del crecimiento de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* mediante la técnica de pozos por halos de inhibición, en agar nutriente por 24 horas a 35°C.

# PRUEBA	COMBINACIONES	CRECIMIENTO	HALOS DE INHIBICIÓN
1	<i>P.aeruginosa (agar)</i> vs. <i>B. cereus (papel)</i>	Sí	Ausencia
2	<i>P.aeruginosa (papel)</i> vs. <i>B. cereus (agar)</i>	Sí	Ausencia

3.3. Análisis Estadístico: determinación de la fuente de carbono y cinética bacteriana óptimas para el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*.

Primero se realizó la curva de calibración a escala McFarland 2 (300 millones/mL) para poder comparar nuestros resultados de absorbancia experimental con la absorbancia y la concentración bacteriana teóricas (Brown, 2007). De igual manera se realizó una gráfica que relaciona estos dos parámetros (absorbancia vs. concentración bacteriana) y la correlación que existe entre ellos es de $R^2:0,9973$ (Anexo C y D).

Los datos obtenidos fueron ingresados a un programa estadístico SAS donde se realizó el cálculo del área bajo la curva de la acción de los tratamientos en el crecimiento bacteriano; de estos resultados se realizó el análisis de variancia y pruebas de significancia.

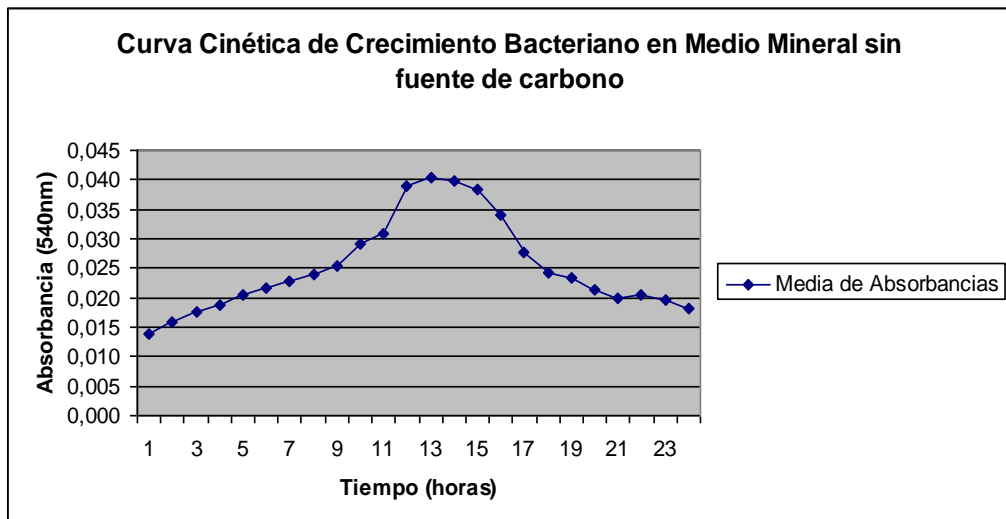
3.3.1. Curvas cinéticas de crecimiento bacteriano

Una vez tomados los datos de absorbancia de cada uno de los tratamientos, se sacó el promedio de las cuatro repeticiones de cada tratamiento y estos datos fueron ingresados al programa estadístico SAS donde se realizó el análisis de varianza y prueba de significancia de Tuckey para determinar si la hipótesis es aceptada o rechazada.

Se obtuvo un número de observaciones diferentes porque en los tratamientos de gasolina-extra y diesel el crecimiento bacteriano fue en 24 horas; y en los tratamientos de tolueno y hexano el crecimiento del consorcio fue en 72 horas. A partir de los promedios de cada tratamiento, se realizó una gráfica donde se pueden apreciar las diferentes fases de crecimiento en cada uno de los tratamientos.

3.3.1.1. Curvas cinéticas de crecimiento bacteriano en medio mineral sin fuente de carbono

En este tratamiento, el consorcio bacteriano tuvo un período de incubación de 24 horas a 35°C. Se pudo apreciar las diferentes fases de crecimiento bacteriano (Gráfica3.1). La gráfica fue realizada en base a los promedios de las cuatro repeticiones del tratamiento en caldo de cultivo Mineral sin fuente de carbono. El punto inicial de absorbancia es de 0,014; lo que representa aproximadamente 1×10^6 bacterias por mililitro, que fue la cantidad inicial establecida para que sea inoculada en el medio de cultivo (Anexo E). El valor de la absorbancia en el punto máximo de crecimiento bacteriano fue de 0,041.



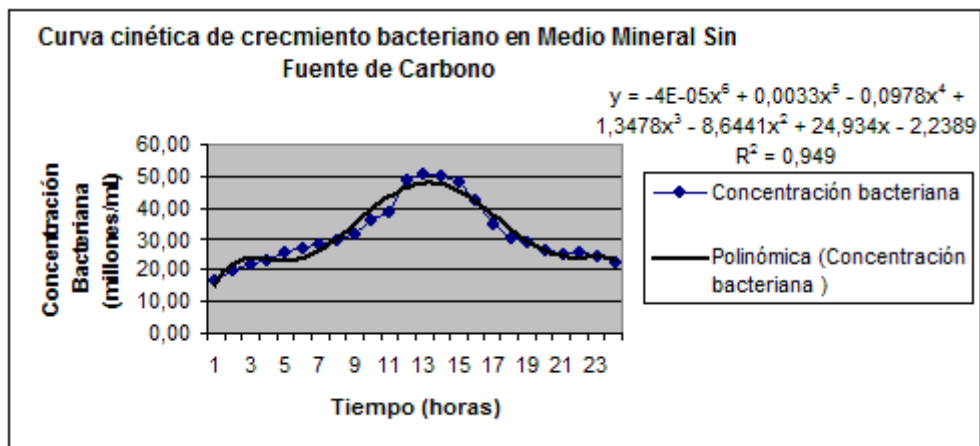
Gráfica 3.1: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral sin fuente de carbono. Tiempo (horas) vs. Absorbancia (540 nm).

Para determinar la concentración bacteriana a partir de los valores de absorbancias en cada tratamiento, se utilizó el valor teórico de absorbancia (0,240 en 540 nm) y concentración bacteriana (300millones/mL) a escala de McFarland 2 (AnexoF).

A partir de esta relación entre absorbancia y concentración bacteriana, se realizó una segunda gráfica que muestra el crecimiento bacteriano por hora durante un período de incubación de 24horas (Gráfica 3.2). La curva estadística que más se asemeja a este experimento es la curva polinómica:

$$y = -4E-05x^6 + 0,0033x^5 - 0,0978x^4 + 1,3478x^3 - 8,6441x^2 + 24,934x - 2,2389$$

Coeficiente de correlación $R^2 = 0,949$.

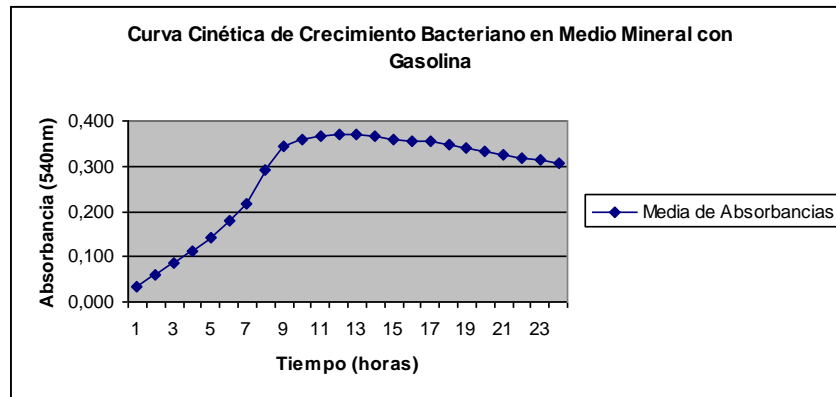


Gráfica 3.2: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral sin fuente de carbono. Tiempo (horas) vs. Concentración bacteriana (millones/mL).

3.3.1.2. Curvas cinéticas de crecimiento bacteriano en medio mineral con gasolina-extra

En este tratamiento, el consorcio bacteriano tuvo un período de incubación de 24 horas a 35°C. Se pudo apreciar las diferentes fases de crecimiento bacteriano (Gráfica3.3). La gráfica fue realizada en base a los promedios de las cuatro repeticiones del tratamiento en caldo de cultivo Mineral con gasolina-extra. El punto inicial de absorbancia es de 0,025 lo que representa aproximadamente 1×10^6 bacterias por

mililitro y el grado de turbidez de la gasolina-extra en el medio de cultivo (0,75 g/mL), puesto que sin gasolina-extra teníamos valores de absorbancia de 0,014 (Anexo G). El valor de la absorbancia en el punto máximo de crecimiento bacteriano fue de 0,371.



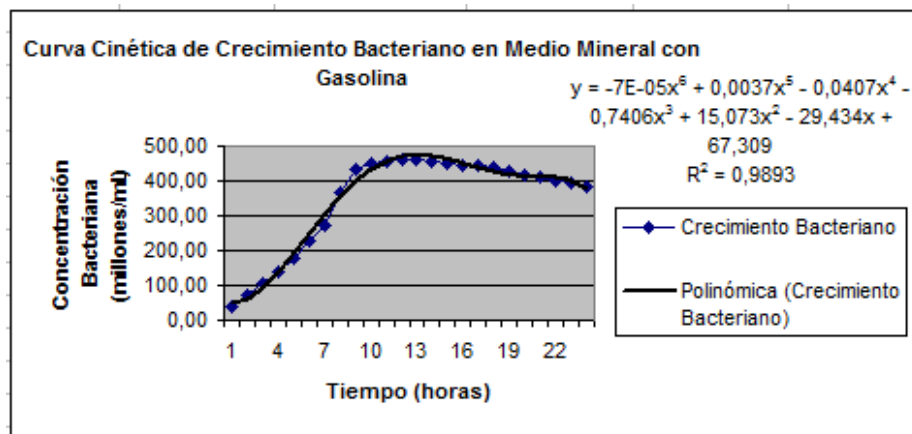
Gráfica 3.3: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral con Gasolina-extra. Tiempo (horas) vs. Absorbancia (540 nm).

Para determinar la concentración bacteriana a partir de los valores de absorbancia en gasolina-extra, se utilizó el valor teórico de absorbancia (0,240 en 540 nm) y concentración bacteriana (300millones/mL) a escala de McFarland 2 (Anexo H).

A partir de esta relación entre absorbancia y concentración bacteriana, se realizó una segunda gráfica que muestra el crecimiento bacteriano por hora durante un período de incubación de 24horas (Gráfica 3.4). La curva estadística que más se asemeja a este experimento es la curva polinómica:

$$y = -7E-05x^6 + 0,0037x^5 - 0,0407x^4 - 0,7406x^3 + 15,073x^2 - 29,434x + 67,309$$

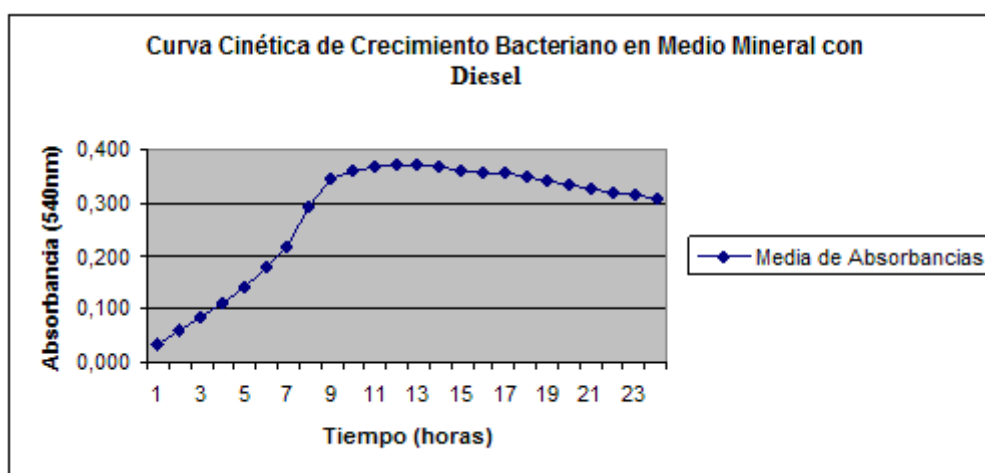
Coeficiente de correlación $R^2 = 0,989$.



Gráfica 3.4: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral con Gasolina-extra. Tiempo (horas) vs. Concentración bacteriana (millones/mL).

3.3.1.3. Curvas cinéticas de crecimiento bacteriano en medio mineral con diesel

En este tratamiento, el consorcio bacteriano tuvo un período de incubación de 24 horas a 35°C. Se pudo apreciar las diferentes fases de crecimiento bacteriano (Gráfica 3.5). La gráfica fue realizada en base a los promedios de las cuatro repeticiones del tratamiento en caldo de cultivo Mineral con diesel. El punto inicial de absorbancia es de 0,029 lo que representa aproximadamente 1×10^6 bacterias por mililitro y el grado de turbidez de este hidrocarburo en el medio de cultivo (0,9 g/mL), puesto que sin fuente de carbono teníamos valores de absorbancia de 0,014 (Anexo I). El valor de la absorbancia en el punto máximo de crecimiento bacteriano fue de 0,346.



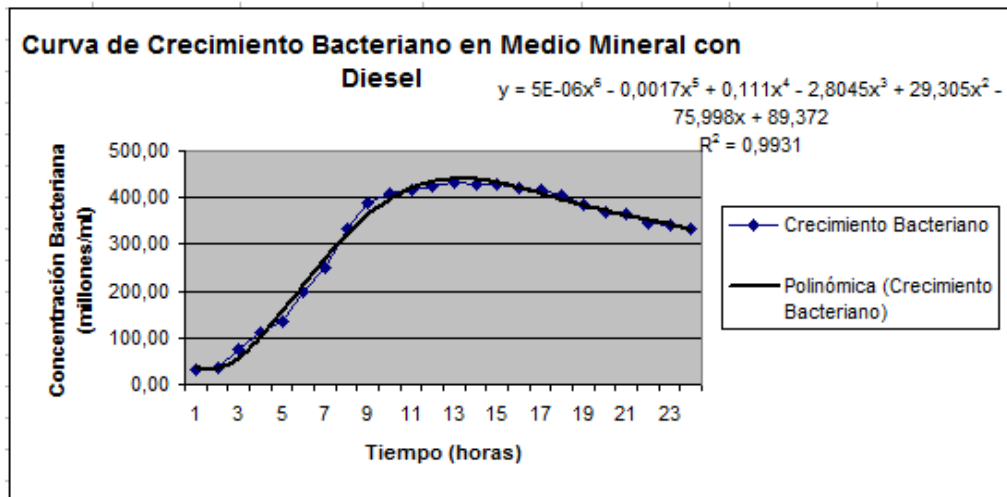
Gráfica 3.5: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral con Diesel. Tiempo (horas) vs. Absorbancia (540 nm).

Para determinar la concentración bacteriana a partir de los valores de absorbancias en diesel, se utilizó el valor teórico de absorbancia (0,240 en 540 nm) y concentración bacteriana (300 millones/mL) a escala de McFarland 2 (Anexo J).

A partir de esta relación entre absorbancia y concentración bacteriana, se realizó una segunda gráfica que muestra el crecimiento bacteriano por hora durante un período de incubación de 24 horas (Gráfica 3.6). La curva estadística que más se asemeja a este experimento es la curva polinómica:

$$y = 5E-06x^6 - 0,0017x^5 + 0,111x^4 - 2,8045x^3 + 29,305x^2 - 75,998x + 89,372$$

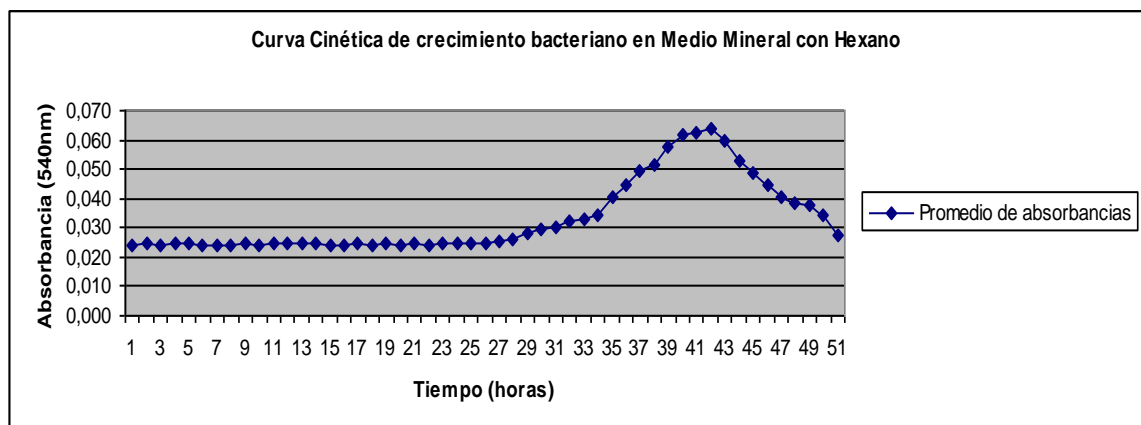
Coeficiente de correlación $R^2 = 0,993$.



Gráfica 3.6: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral con Diesel. Tiempo (horas) vs. Concentración bacteriana (millones/mL).

3.3.1.4. Curvas cinéticas de crecimiento bacteriano en medio mineral con Hexano.

Para el tratamiento de hexano, se tomaron datos de absorbancia durante tres días, hasta que las bacterias empezaron a entrar a la fase de muerte. Se pudo apreciar las diferentes fases de crecimiento bacteriano (Gráfica 3.7). La gráfica fue realizada en base a los promedios de las cuatro repeticiones del tratamiento en medio mineral con hexano. El punto inicial de absorbancia es de 0,024 lo que representa aproximadamente 1×10^6 bacterias por mililitro y el grado de turbidez del hexano en el medio de cultivo (Anexo K). El valor de la absorbancia en el punto máximo de crecimiento bacteriano fue de 0,064.



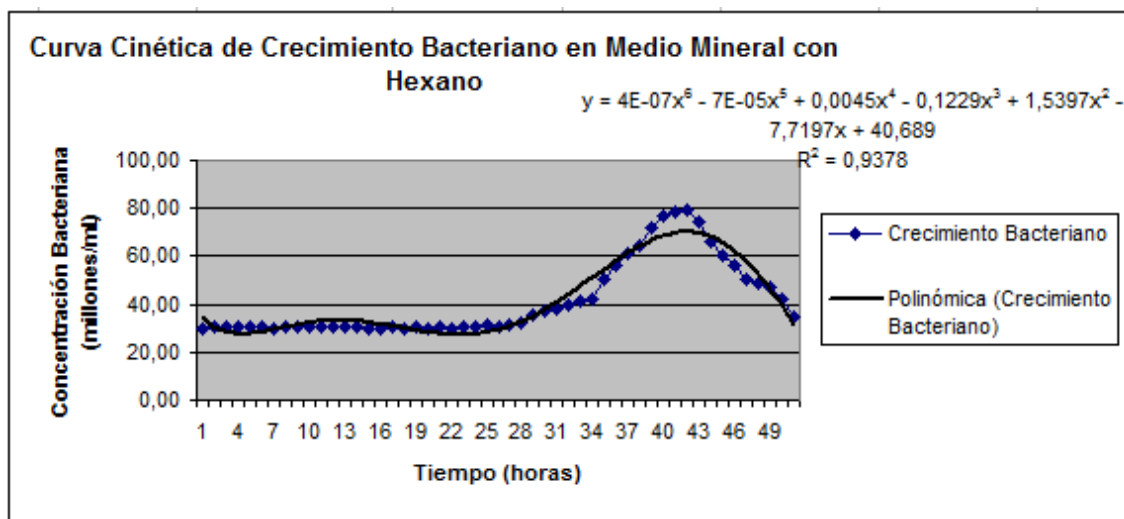
Gráfica 3.7: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral con Hexano. Tiempo (horas) vs. Absorbancia (540 nm).

Para determinar la concentración bacteriana a partir de los valores de absorbancia en hexano, se utilizó el valor teórico de absorbancia (0,240 en 540 nm) y concentración bacteriana (300millones/mL) a escala de McFarland 2 (Anexo L).

De esta tabla se realizó una segunda gráfica que muestra el crecimiento bacteriano por hora durante un período de incubación de 72horas (Gráfica 3.8). La curva estadística que más se asemeja a este experimento es la curva polinómica:

$$y = 4E-07x^6 - 7E-05x^5 + 0,0045x^4 - 0,1229x^3 + 1,5397x^2 - 7,7197x + 40,689$$

Coefficiente de correlación $R^2 = 0,937$.

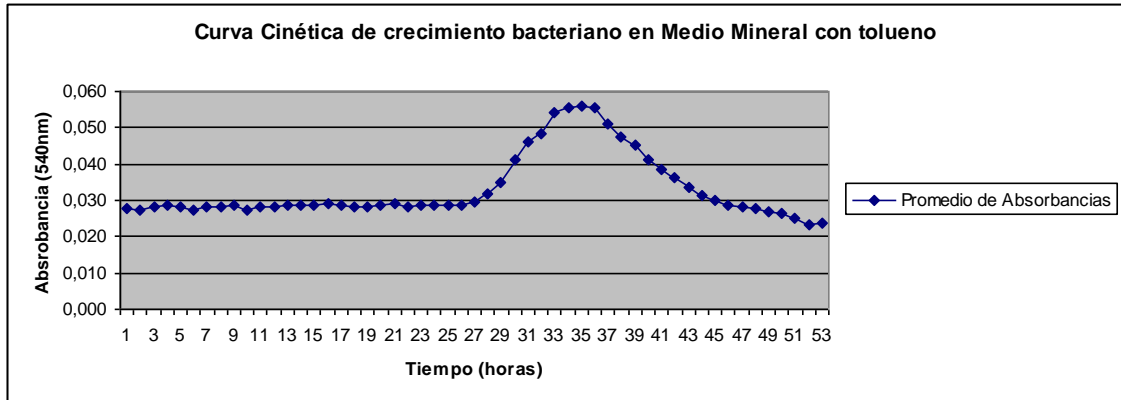


Gráfica 3.8: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral con Hexano. Tiempo (horas) vs. Concentración bacteriana (millones/mL).

3.3.1.5. Curvas cinéticas de crecimiento bacteriano en medio mineral con Tolueno

Para el tratamiento con tolueno, se tomaron datos de absorbancia durante tres días, hasta que las bacterias empezaron a entrar a la fase de muerte. Se pudo apreciar las diferentes fases de crecimiento bacteriano (Gráfica 3.9). La gráfica fue realizada en base a los promedios de las cuatro repeticiones del tratamiento en medio mineral con tolueno. El punto inicial de absorbancia es de 0,028 lo que representa aproximadamente 1×10^6

bacterias por mililitro y el grado de turbidez del tolueno en el medio de cultivo (0,87g/mL) (Anexo M). El valor de la absorbancia en el punto máximo de crecimiento bacteriano fue de 0,056.



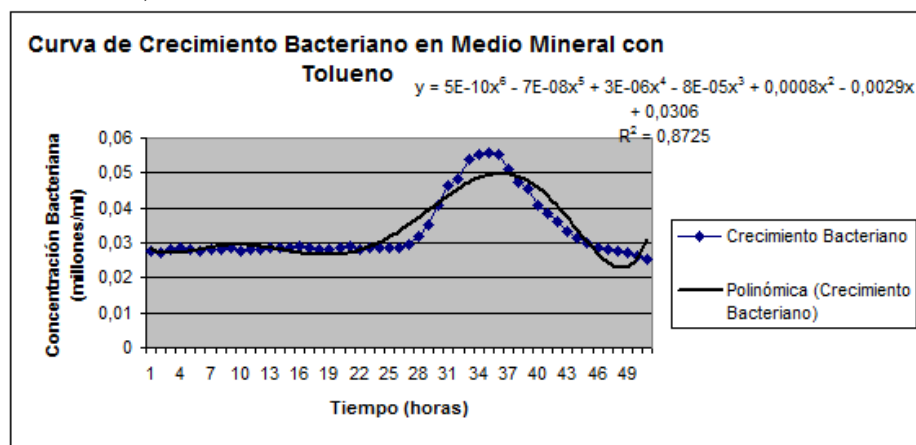
Gráfica 3.9: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral con Tolueno. Tiempo (horas) vs. Absorbancia (540 nm).

Para determinar la concentración bacteriana a partir de los valores de absorbancia en tolueno, se utilizó el valor teórico de absorbancia (0,240 en 540 nm) y concentración bacteriana (300millones/mL) a escala de McFarland 2 (Anexo N).

De esta tabla se realizó una segunda gráfica que muestra el crecimiento bacteriano por hora durante un período de incubación de 72horas (Gráfica 3.10). La curva estadística que más se asemeja a este experimento es la curva polinómica:

$$y = 5E-10x^6 - 7E-08x^5 + 3E-06x^4 - 8E-05x^3 + 0,0008x^2 - 0,0029x + 0,0306$$

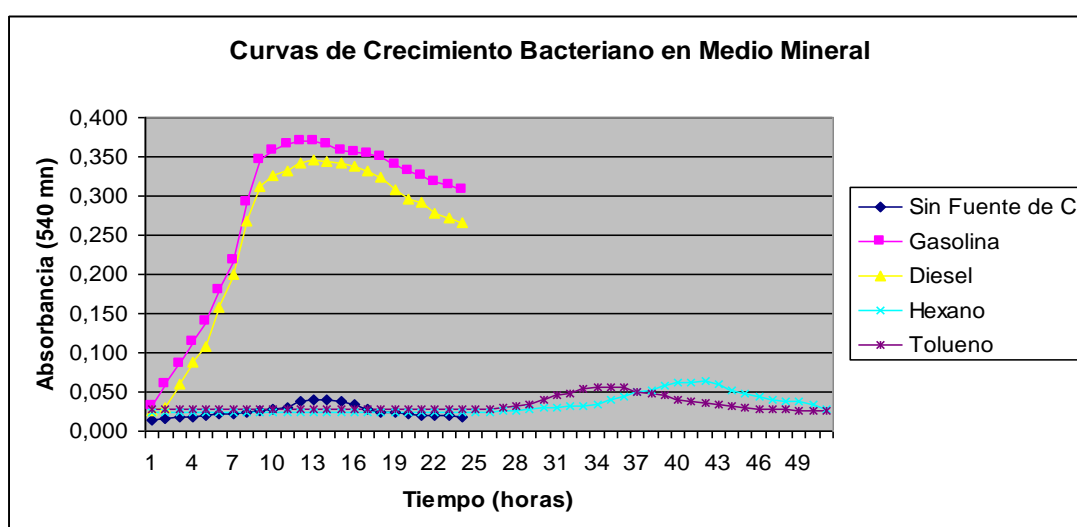
$$R^2 = 0,872.$$



Gráfica 3.10: Curva cinética de crecimiento bacteriano en medio Mineral con Tolueno. Tiempo (horas) vs. Concentración bacteriana (millones/mL).

3.3.1.6. Curvas cinéticas de crecimiento bacteriano en los diferentes tratamientos de fuentes de carbono.

En base al promedio de los datos obtenidos en cada tratamiento, se realizó una gráfica (Gráfica 3.11) que indica el crecimiento del consorcio bacteriano ante la presencia de las diferentes fuentes de carbono en el medio mineral.



Gráfica 3.11: Curvas cinéticas de crecimiento bacteriano en medio Mineral con las diferentes fuentes de carbono. Tiempo (horas) vs. Absorbancia (540 nm).

3.4. Análisis de datos por medio del programa estadístico SAS para la determinación de la fuente de carbono y cinética bacteriana óptimas.

Una vez ingresados los datos en el programa estadístico SAS se realizó el cálculo del área bajo la curva y el análisis estadístico de los datos de absorbancia obtenidos.

En cada una de las repeticiones de los cinco tratamientos se realizó el cálculo del área bajo la curva dentro del Diseño estadístico completamente al azar.

El cuadro que se presenta a continuación (Cuadro 3.6.) muestra la información básica que se requiere para el análisis estadístico del experimento y a partir de estos datos se inicia con el ADEVA para el cálculo del ABCPT (área bajo la curva del progreso del tratamiento). Se presentan cinco (5) efectos o tratamientos bien definidos, en condiciones homogéneas (Anexo O).

Cuadro 3.6: Datos para el análisis estadístico con las diferentes fuentes de carbono en medio mineral con *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*.

Información de nivel de clase para el ANOVA			
ADEVA para ABCPT		09:41 Tuesday, February 10, 2009	
Clase	Niveles	Valores	
Efecto	5	Diesel	
		Hexano	
		Tolueno	
		Gasolina-extra	
		Sin C	
Número de observaciones leídas:		20	
Número de observaciones usadas:		20	

El cuadro 3.7 presenta el análisis estadístico realizado en el programa SAS (SAS, 1998) y los resultados se presentan a continuación. El valor de F calculado es mayor al F encontrado en las tablas al 95%, 99%; por lo que existe alta significancia estadística. De igual manera el R^2 es de 0,998 lo que muestra que las condiciones del experimento se mantuvieron homogéneas y por lo tanto los datos no presentan alta variabilidad. El coeficiente de variación mide el porcentaje de error que se puede producir en un experimento y en nuestra investigación obtuvimos un 2.9% y se encuentra inferior al máximo rango de variación aceptado dentro de un laboratorio (5%-8%).

Cuadro 3.7: Análisis del ANOVA a partir de los datos obtenidos de las áreas bajo la curva de los tratamientos en Medio Mineral con *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*.

Análisis del ANOVA para las diferentes fuentes de carbono				
Fuente de variación	G.L.	S.C	CM	Fcal
Total	19	103.884	-	-
Tratamiento	4	103.729	25.932	2515.73**
Error exp.	15	0.154	0.010	-
R²		0.998		
Coefficiente Variación		2.909		

** alta significancia estadística.

En el cuadro 3.8 se puede apreciar la prueba de significancia de Tukey y los rangos de agrupación entre los diferentes tratamientos. De esta manera se pueden establecer las diferencias entre las fuentes de carbono y si hay alguna similitud entre alguno de los tratamientos.

Cuadro 3.8: Prueba de significancia de Tukey para las diferentes fuentes de carbono en el Medio Mineral con *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*.

Prueba de significancia Tukey			
Alfa	0.05		
Error de G.L.	15		
Error de C.M.	0.010		
Q (valor crítico estandarizado)	4.366		
Diferencia significativa min.	0.221		
Efecto	Agrupamiento	Media	Número de observaciones
Gasolina-extra	a	6.487**	4
Diesel	b	5.841**	4
Tolueno	c	2.316 ^{ns}	4
Hexano	c	2.213 ^{ns}	4
Sin C	d	0.591 ^{ns}	4

^{ns} no significancia estadística.

* significancia estadística.

** alta significancia estadística.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1. Pureza Bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*.

4.1.1. Determinación de las características macroscópicas y microscópicas de las bacterias.

La determinación de la pureza bacteriana nos permitió confirmar que las bacterias entregadas por la empresa Qmax fueron las requeridas para la investigación. Tanto *Pseudomonas aeruginosa* como *Bacillus cereus*, al no provenir de cultivos certificados, se requirieron determinar su género y especie.

El proceso de siembra de las bacterias fue realizado en zig-zag, con parámetros físico-químicos previamente establecidos en estudios realizados por Ruales (2005). De esta manera se pudo determinar las características macroscópicas de las bacterias. En agar nutriente, después de 24 horas de incubación a 35 °C, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa* presentaron un crecimiento puro con características propias de cada especie.

Pseudomonas aeruginosa presentó características macroscópicas y microscópicas muy parecidas a las encontradas en bibliografía. Según Balch & Smith (1994) esta bacteria tiene un crecimiento característico en Agar nutriente, puesto que es una bacteria que posee movilidad y creció a lo largo del zig-zag y en sitios alrededor a la estría de siembra. Ocasionó cambio de color en el medio de cultivo y el crecimiento de sus colonias puras fue de borde entero circular y color beige brillante. Según Fuenmayor & Rodríguez (1992) esa bacteria secreta una gran variedad de pigmentos como piocianina y fluoresceína; ocasionando alteraciones en los medios de cultivo donde se da el crecimiento, como por ejemplo en agar nutriente hubo cambios de color de amarillo a verde y en Agar Cetrimide hubo también alteración del medio de cultivo

amarillo a verde brillante con formación de colonias puras verde brillantes. A través del microscopio óptico se confirmó que *P. aeruginosa* es un coco-bacilo de color rojo, gram negativo (Balch & Smith, 1994).

Por otro lado *Bacillus cereus* creció fácilmente en Agar nutriente después de 24 horas, las características generales obtenidas se pueden avalar con los estudios realizados por Buesa (1981), quién demostró que *B. cereus* es una bacteria de color beige no brillante, irregular, de aproximadamente 5 mm de diámetro y conserva el color amarillo del medio de cultivo. Esta bacteria produce una enzima llamada lecitinasa que actúa en el medio de cultivo Agar yema de huevo (Agar *Bacillus cereus*), haciendo que este medio cambie de color de rojo a tomate y a lo largo de la estría de crecimiento se formen precipitados de color rojo, confirmando así la acción de esta enzima. De igual manera a través del microscopio óptico se pudo ver que *B. cereus* son bacillos, gram positivos con presencia de esporas (Atlas & Bartha, 2002).

4.1.2. Pruebas de identificación de género y especie de *P. aeruginosa* y *Bacillus cereus*.

Mediante el análisis macroscópico y microscópico se pudo determinar el género y especie de las bacterias, sin embargo con la ayuda de las claves de identificación API nos aseguramos y llegamos a una total confiabilidad de que bacterias se necesitan para el estudio eran *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*.

Cada una de estas bacterias presentan características específicas frente a la presencia de diferentes hidratos de carbono y después de un tiempo de incubación se dio un cambio de color debido a la fermentación.

En base al API 50CH se pudo determinar la presencia de *Bacillus cereus* después de 24 y 48 horas de incubación. Las reacciones que más se destacan en este microorganismo son la fermentación de la glucosa, fructosa, ribosa, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, trehalosa, acetil glucosamina y Gluconato potásico (Biomérieux, 2005). Estas reacciones positivas fueron obtenidas en el experimento y de esta manera se confirma con exactitud la presencia de *Bacillus cereus*.

De igual manera la incubación de *Pseudomonas aeruginosa* en el API 20E confirmó la presencia de este microorganismo. En base a las pruebas bioquímicas de Biomérieux (2005) se demostró con certeza que *P.aeruginosa* fermenta los siguientes hidratos de carbono: arginina, citrato trisódico, urea, triptófano, gelatina, glucosa, melobiosa, arabinosa, citocromo oxidasa.

4.2. Antagonismo bacteriano entre *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*

Una vez confirmado el género y especie de las bacterias necesarias para el estudio, se determinó la presencia o ausencia de competencia entre *P. aeruginosa* y *Bacillus cereus*.

En este proyecto se comprobó que las bacterias no compiten por el alimento y pueden vivir juntas. Para esto se utilizaron dos métodos de análisis: Placa de agar con discos de papel y pozos por halos de inhibición. En ambos procedimientos se contrapuso a cada bacteria y se realizó el crecimiento de las mismas por 24 horas a 35 °C, no hubo formación de halos de inhibición entre las bacterias.

En base a bibliografía previamente analizada se han encontrado estudios que confirman la relación bacteriana entre *P. aeruginosa* y *B. cereus*. Por ejemplo estudios realizados en la Universidad de Zulia, Venezuela (Soto, 2001; Rivera, 2000) demostraron el crecimiento en conjunto de los géneros de *Pseudomonas spp.* y *Bacillus spp.* en el medio de cultivo Mineral con diferentes fuentes de hidrocarburos. De igual manera en Long Beach California, Bongkeun (2000) y Hideki (2000) aplicaron la biorremediación *in situ* en suelos contaminados con gasolina-extra y aceite diesel; utilizaron un consorcio bacteriano de *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilis*, *Acinetobacter junii*, y *Pseudomonas aeruginosa*. Benavides *et al.*, (2004) aislaron cepas con una alta capacidad para degradar hidrocarburos y este consorcio bacteriano aislado fue: *Bacillus cereus*, *Mycobacterium austroafricanum*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia rubidae*. Estas bacterias se encargaron de degradar el 86% de metil t-butyl eter y grupos 3-metil de acuíferos con contenido de petróleo, gasolina-extra y diesel. Otros estudios realizados para confirmar la simbiosis entre *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* son los trabajos efectuados por Arenas en

1999, donde aisló diferentes cepas bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. mendocina*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus* y *Acinetobacter calcoaceticus* y de las cuales evaluó su capacidad degradativa en conjunto. El 100% de ellas creció en medios de cultivo cuya fuente de carbono eran derivados del petróleo como gasolina-extra, querosene y diesel; ninguna de estas bacterias presentó inhibición ante la presencia de la otra. De igual manera Díaz en 1999, evaluó la biodegradación de hidrocarburos por un consorcio microbiano conformado por *Bacillus cereus*, *Serratia rubidae*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa*. Sembraron el consorcio microbiano en medio mineral líquido, que contenía hidrocarburos y al cabo de este tiempo cuantificaron la concentración de hidrocarburos y la presencia de cada una de estas bacterias, demostrándose así que el consorcio bacteriano actuó en conjunto sin ningún tipo de inhibición.

4.3. Determinación de la fuente de carbono y cinética bacteriana óptimas para el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*.

Para la determinación de la fuente de carbono óptima se inoculó el consorcio bacteriano en el medio mineral, elaborado por Qmax, el cual fue probado con diferentes fuentes de carbono. Se midió la absorbancia por hora de cada tratamiento. Una vez finalizado el período de incubación se pudo ver que las bacterias tuvieron un buen crecimiento en gasolina-extra, llegando en menos de 24 horas, a valores de absorbancia máximos de 0,371. Un efecto similar sucedió en diesel, donde en menos de 24 horas el crecimiento del consorcio alcanzó valores de absorbancia de 0,346. En comparación a los demás tratamientos donde alcanzaron valores máximos de absorbancia de 0,056 (tolueno) y de 0,064 (hexano) después de 48 horas de incubación.

En todos los tratamientos se pudieron observar que el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*, tendían a un mismo comportamiento cinético donde la mejor tendencia de curva estadística era la polinómica. Esto se confirma con Rose (1977) donde se demuestra que el crecimiento cinético de una población bacteriana se compone por diferentes fases, tendiendo a una gráfica polinómica: fase de latencia (lag), fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. En los tratamientos con gasolina-extra, diesel y sin fuente de carbono, las bacterias

tuvieron un período de adaptación (fase lag) inferior a las siete horas y partir de las ocho horas se pudo ver que las bacterias entraron a la fase exponencial. La fase estacionaria permaneció hasta aproximadamente las 20 horas y a partir de las 24 horas inició el período de muerte. En cambio en los tratamientos con tolueno y hexano *P. aeruginosa* y *Bacillus cereus* tuvieron un período de latencia mayor a las 55 horas. A partir del cual hubo un crecimiento exponencial hasta las 60 horas, permanecieron aproximadamente unas cinco horas en estado estacionario y a partir de las 66 horas entraron a la fase de muerte.

El elemento principal de todas las células vivas es el carbono, que se presenta en un 50% como requerimiento nutricional y físico para sostener sus vidas. El crecimiento y reproducción de las bacterias ocurre a medida que los nutrientes son procesados e incorporados como nuevo material de célula (Rose, 1977). Por esta razón el tratamiento testigo que no incluía fuente de carbono, alcanzó valores de absorbancia máximos de 0,041 y en menos de 24 horas las bacterias murieron.

La gasolina-extra está compuesta por la combinación de diferentes hidrocarburos que contienen de 5 a 12 carbonos entre los que podemos mencionar los compuestos alifáticos, alifáticos ramificados, aromáticos y compuestos cíclicos (Atlas, 1991). Basándonos en la composición de sus cadenas lineales, las bacterias tuvieron una mayor facilidad de romper dichas cadenas y por lo tanto asimilar el carbono para utilizarlo como fuente de alimento y energía. Lo mismo ocurrió cuando se colocó como fuente de carbono el diesel, esta sustancia está compuesta por hidrocarburos alifáticos, alifáticos ramificados, aromáticos y compuestos cíclicos de entre 10 a 25 átomos de carbono (Fernández *et al.*, 1992). De igual manera tanto la gasolina-extra como el diesel son sustancias polares, volátiles y de baja densidad (gasolina $d= 0,75$ g/mL; diesel $d=0,9$ g/mL) razones por las cuales son fácilmente absorbidas y asimiladas por las paredes celulares de las bacterias. Estudios realizados por la empresa Qmax han demostrado que tanto *Pseudomonas aeruginosa* como *Bacillus cereus* son capaces de crecer independientemente en gasolina-extra, diesel, tolueno y hexano; sin embargo la fuente de carbono donde hubo un mayor crecimiento fue en gasolina-extra (Ruales, 2006). En los procesos metabólicos, los microorganismos transforman los alcanos que obtienen del ambiente en sustancias más simples (carbono), y en este proceso obtienen materia y energía que utilizan para su subsistencia (Cerniglia, 1993).

El hexano a pesar de ser un alcano de cadena lineal posee propiedades que afectan la cinética microbiana y por tanto las bacterias van a tener dificultad para asimilar esta sustancia como fuente de carbono. Es un compuesto hidrofóbico, apolar y muy tóxica para los microorganismos (Merino, 1998). Por estas razones el valor máximo de absorbancia que alcanzaron las bacterias en hexano fue de 0,064. Este mismo fenómeno ocurrió cuando se inoculó al consorcio bacteriano en tolueno, el valor máximo de absorbancia fue de 0,056. Este hidrocarburo aromático está conformado por un anillo bencénico que presenta similares características que el hexano puesto que es un compuesto recalcitrante, de baja polaridad y tóxico. Su composición limita a que las bacterias puedan destruir fácilmente el anillo de benceno y al tener una baja polaridad, va a tener dificultad en ser absorbido y asimilado (Chaineau *et al.*, 1995).

En este estudio se demostró también que el consorcio bacteriano conformado por *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa* son capaces de crecer en las diferentes fuentes de carbono: gasolina-extra, diesel, tolueno y hexano. Esto lo podemos confirmar en proyectos realizados por Ruales en el 2006 que utilizó a *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Serratia rubidae* para determinar su capacidad de degradación en el medio mineral con diesel, tolueno, gasolina-extra y hexano. La fuente de carbono que más estimuló el crecimiento de cada una de estas bacterias fue la gasolina-extra debido a su polaridad, volatilidad, y a la presencia de cadenas alifáticas de fácil degradación. En Venezuela Soto (2001) y Rivera (2000) demostraron el crecimiento de *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp* y *Micrococcus spp.* en el medio mineral con hexano y a este medio se le añadieron diferentes sustratos para medir su capacidad de degradación. Los sustratos utilizados y por tanto degradados a diferentes concentraciones fueron naftaleno, antraceno, tolueno, diesel y fenantreno. Demostrándose así que estas bacterias poseen un gran potencial para la biorecuperación de los sustratos impactados por derrames petroleros. En Estados Unidos Bongkeun (2000) y Hideki (2000) aplicaron la biorremediación *in situ* en suelos contaminados con gasolina-extra y diesel. Utilizaron microorganismos autóctonos como *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilis*, *Acinetobacter junii*, y *Pseudomonas aeruginosa* y adicionaron nutrientes y oxígeno en el suelo. Después de un tiempo determinado se pudo ver que estas bacterias poseen la capacidad de sobrevivir, biodegradar y utilizar estos hidrocarburos como alimento. Benavides en el 2004 aisló

cepas con alta capacidad para degradar gasolina-extra, keroseno y diesel provenientes de acuíferos contaminados. Las cepas identificadas por medio de la secuenciación del 16S ribosomal fueron: *Bacillus cereus*, *Mycobacterium austroafricanum*, *P. aeruginosa* y *Serratia rubidaea*. De esta manera las bacterias utilizaron como fuente de carbono y sustrato de crecimiento los n-alcanos y multimetil, donde degradó el metil t-butil eter, y grupos 3-metil, provenientes de estos tres hidrocarburos. Otros estudios que demuestran la capacidad de estas bacterias para sobrevivir en diferentes tipos de hidrocarburos son los proyectos realizados por Merino en 1998, quién realizó estudios con microorganismos nativos. Aisló las bacterias a partir de muestras de suelo y agua procedentes de la refinería de “La Pampilla” y evaluó la actividad degradativa y emulsificante de estos microorganismos con hidrocarburos como: gasolina-extra, diesel, benceno, antraceno y hexano. Los microorganismo con mayor capacidad degradativa fueron *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia rubidaea*. De igual manera Díaz en 1999 evaluó la biodegradación de hidrocarburos por un consorcio microbiano conformado por *Bacillus cereus*, *Serratia rubidaea*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa*. Sembró el consorcio microbiano en medio mineral líquido, que contenía hidrocarburos (35000 ppm) como única fuente de carbono y energía, luego lo incubó a 35°C en agitación durante 35 días con su control diario respectivo. Al cabo de este tiempo cuantificó la concentración de hidrocarburos, obteniendo una biodegradación del 62.28%.

4.4. Análisis estadístico para determinación de la fuente de carbono y cinética bacteriana óptimas en el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*.

Mediante los resultados obtenidos por medio del programa estadístico SAS, se obtuvieron los valores del área bajo la curva y a través de estos pudimos determinar que el mejor tratamiento fue la gasolina-extra al tener una AUDPC superior a las demás fuentes de carbono. Llegando a valores de entre 6,286-6,716 en comparación a los resultados obtenidos en hexano (2,167-2,234) y tolueno (2,258-2,409). Con respecto al diesel se obtuvo valores de AUDPC cercanos a la gasolina-extra (5,812-5,879) lo que demuestra que tanto la gasolina-extra como el diesel son buenas fuentes de carbono para *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*. Esto se pudo comprobar previamente en

estudios realizados por Ruales (2006) quién realizó el cultivo de estas bacterias, independientemente, en el medio mineral con tolueno, hexano, gasolina-extra y diesel. Comprobó que estas bacterias crecieron bien en gasolina-extra, más no en tolueno y hexano, al ser compuestos de baja solubilidad en el agua, recalcitrantes y tóxicos.

En el análisis realizado del ANOVA obtuvimos que el valor de F calculado (2515,73) es mayor al F encontrado en las tablas (3,11-5,03) al 95%, 99%; demostrándose así que existe alta significancia estadística. Mediante este resultado se acepta la hipótesis alternativa, en la que se demuestra que ningún tratamiento es igual a otro ($H_a: t_1 \neq t_2 \neq t_3 \neq t_4 \neq t_5 \neq t_6 \neq t_7 \neq t_8 \neq t_9 \neq t_{10} \neq t_{11} \neq t_{12} \neq t_{13} \neq t_{14} \dots t_n$) y ninguno produce la misma absorbancia o crecimiento bacteriano en el medio de cultivo mineral. De igual manera obtuvimos que el coeficiente de variación fue 2,9% y el de correlación de 0,998. Lo que demuestra que el experimento mantuvo las condiciones físico-químicas y ambientales estables.

A través de las pruebas de significancia pudimos demostrar también que ningún tratamiento es igual a otro y que los mejores tratamientos para el crecimiento del consorcio bacteriano fueron en gasolina-extra (6.487) y diesel (5.841), donde obtuvimos valores de alta significancia estadística en comparación a los valores obtenidos en tolueno (2.316), hexano (2.213) y sin fuente de carbono (0.591) que no tuvieron significancia estadística.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

1. Mediante las pruebas macroscópicas, microscópicas y claves de identificación API 50 CH y API 20E; se pudo confirmar y determinar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* en las muestras entregadas por Qmax. De igual manera se determinó con total confiabilidad su género y especie, gracias a que estas bacterias reaccionaron ante la presencia de diferentes hidratos de carbono y después de un tiempo de incubación se pudieron determinar las fermentaciones positivas de estos microorganismos.
2. En las pruebas de antagonismo no hubo formación de halos de inhibición, por lo tanto *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* pueden crecer juntas sin hacerse competencia entre ellas.
3. Por medio de las curvas cinéticas se pudo confirmar que el principal elemento de nutrición bacteriana es la fuente de carbono, sobretodo la que proviene de compuestos alifáticos y que sean fácilmente asimilables por *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*, como el diesel y la gasolina-extra. A través del tratamiento sin fuente de carbono se pudo ver que las bacterias crecieron deficientemente y murieron en menos de 24 horas.
4. El análisis del ANOVA reveló un coeficiente de variación de 2,9% y de correlación de 0,998; lo que confirma que el experimento se llevó a cabo de una manera eficiente manteniendo homogéneas las condiciones ambientales, químicas y físicas óptimas.
5. Mediante la prueba de significancia de Tukey se comprobó que los tratamientos de diesel y gasolina-extra fueron los mejores y los que obtuvieron alta significancia estadística, considerado a la gasolina-extra como la fuente de

carbón óptimo. Los demás tratamientos : tolueno, hexano y sin fuente de carbón no obtuvieron significancia estadística, por lo que se los puede eliminar como tratamientos.

6. La hipótesis estadística planteada en el trabajo fue aceptada, puesto que la mejor fuente de carbón que estimuló un buen crecimiento del consorcio bacteriano conformado por *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa*, fue la gasolina-extra (24 horas a 35°C). De igual manera se demostró que ningún tratamiento es igual al otro y el consorcio bacteriano tuvo un diferente crecimiento cinético en cada una de las fuentes de carbón.

CAPÍTULO 6

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda dar un mantenimiento quincenal a estas bacterias por medio de la técnica de zig-zag en tubos inclinados con agar nutriente, para conservar sus características y propiedades químico biológicas. Deben permanecer refrigeradas aproximadamente a 4⁰C, pH de 7,2; en un tiempo máximo de 15-30 días.
2. Se sugiere utilizar otros métodos de conservación bacteriana que mantengan un 80% de viabilidad celular, eviten la contaminación y mantengan las células bacterianas genéticamente estables. Los métodos de conservación más usados son: congelación con nitrógeno líquido a -80⁰C, deshidratación, liofilización, uso de agentes crioprotectores como el glicerol, vaselina estéril, aceite mineral.
3. El uso de *Serratia rubidae* puede complementarse en este estudio y así aumentar a otro microorganismo para el consorcio bacteriano. Existen estudios previos realizados por la empresa Qmax que usan estas tres bacterias.
4. Este estudio fue un plan piloto realizado a nivel de laboratorio, pero puede ser escalado a volúmenes mayores. Resulta importante dar continuidad a la presente investigación, para obtener un biorreactor que produzca grandes volúmenes de medio de cultivo con este consorcio bacteriano y cuando haya algún tipo de derrame, ya sea en el suelo o en el agua, realizar una biorremediación *in situ* con la ayuda de estas bacterias que usen como fuente de carbono el hidrocarburo. Manteniendo siempre las condiciones de temperatura, humedad y pH óptimas para su crecimiento.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- 7.1. Alexander, M. (1981). Biodegradation of Chemicals of Environment Concern, Nueva York. Science. Vol. 211; 9.
- 7.2. Alexander, M. (1991). Introduction to Soil Microbiology, Londres. Science. Vol. 511: 3.
- 7.3. Arenas, L. (1999). Aislamiento y evaluación de la actividad emulsificante y degradativa de bacterias provenientes de suelos y agua de la Refinería La Pampilla. Universidad de Lima. Perú.
- 7.4. Atlas, R. (1991). Microbial Hydrocarbon Degradation-Bioremediation of Oil Spills. Journal of Chemical Technical Biotechnol. Vol. 52 149-156p.
- 7.5. Atlas, R. & R., Bartha. (2002). Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Madrid. Cuarta Edición. Editorial Pearson Educación, SA. 677p.
- 7.6. Baker, K. H. (1994). Bioremediation of surface and subsurface soils. Nueva York. Editorial McGraw-Hill. 203-259p.
- 7.7. Baltch, A.L & R. P. Smith (1994) Pseudomonas Aeruginosa: Infections and Treatment. Nueva York. Editorial Marcel Dekker. 344-347p.
- 7.8. Barnard, J. (1998). Cut P and N without Chemicals. Chicago. Revista water & water Engineering. Vol. 11. 7p.
- 7.9. Bayona, J. M., J. Albaigés, A. M. Solanas, R. Parés, P. Garrigues y M. Ewald. (1986). Selective aerobic degradation of methyl-substituted polycyclic

- aromatic hydrocarbons in petroleum by pure microbial cultures. Int. J. Environ. Anal. Chem.. 23:289-303.
- 7.10. Bayona J, Casellas, M., P. Fernández y A. M. Solanas. (1995). Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona. España. Revista Chemosphere 30:725-740.
- 7.11. Bayona J, Solanas, A. M., R. Parés, y J. Albaigés. 1986. Degradation of aromatic petroleum hydrocarbons by pure microbial cultures. Revista Chemosphere. 13:593-601p.
- 7.12. Benavides, J. , Roldan, F., Ocampo, A., Londoño, M., Pardo, A., Perdomo, C. (2004). Efecto de la adición de nutrientes (nitrógeno y fósforo) e identificación de microorganismos degradadores de hidrocarburos de suelos contaminados con petróleo. Universidad de la Salle. Facultad de Ingeniería ambiental. Ambiental. Bogotá.
- 7.13. Bergey, D. (1994), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Novena Edición. 289-304p.
- 7.14. Biomerieux, S.A. (2005). Catálogo de análisis para API 20 E y 50CH. Marcy-l'Etoile. Francia.
- 7.15. Bongkeun, S., Norberto, J., Palleroni, M. (2000) Isolation and characterization of diesel degrading bacteria from soils and sediments. Applied and Environmental Microbiology. 66(8): 3446-3453.
- 7.16. Bonilla, A., Cuesta, P., Hierro, B., (1999) Recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos: utilización de la técnica de venteo y aplicación de modelos de simulación. Monterrey. México.
- 7.17. Bossert, I., & R. Bartha. (2003). The fate of petroleum in soil ecosystems. In: ATLAS R.M. (Ed.), Petroleum Microbiology. Macmillan Publishing Co., New York. EE.UU. 473 p.

- 7.18. Bracho, M., D., Laugeny. (2002). Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias nativas aisladas de suelos contaminados. Universidad de Zulia, Venezuela.
- 7.19. Bracho, M., Diaz, L. y Soto, L. (2004). Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo. Estado Zulia, Venezuela. Bol. Centro Invest. Biol. [online]. vol.38, no.3, p.176-185. Extraído el 21 de enero, 2008, de http://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-538X21004012000002&lng=es&nrm=iso. ISSN 0375-538X.
- 7.20. Brock, P., Madigan, M., Martinko, J. (1999) Biología de los microorganismos. Madrid. Octava edición. Editorial Pearson Prentice-Hall International. 985-986p.
- 7.21. Brown, A. (2007). Benson's microbiological applications laboratory manual in general microbiology. New York. Mc-Graw Hill. 420p.
- 7.22. Buesa, M. (1981). Bacillus cereus: epidemiología, patogenicidad y patogenia. Revista Cubana de Medicina Tropical. Vol 33(2). pp121-7.
- 7.23. Bundy, J.G., G.I. Paton & C. D. Campbell. (2002). Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination. J. Appl. Microbiol. 92 :276-288p.
- 7.24. Campbell, C.L. & Madden, L. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley and Sons. New York, EE.UU. 532p.
- 7.25. Casellas, M., M. Grifoll, J. Sabate y A. M. Solanas. (1998). Isolation and characterization of a 9-fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. *Can. J. Microbiol.* 44:734-742.

- 7.26. Cerniglia, C. E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation 3:351-368p.
- 7.27. Clark, D. (1989). Biotransformation pathways of hazardous energetic organic compounds. Kamely editors, Portofolio Publishing Co, Houston. EE.UU. 345-361 p.
- 7.28. Collins, CH., Lyne, P., Grange, J., (1999). Placa de agar con discos de papel. Collins & Lyne's Microbiological Methods. 7° edición. Butterworth Heinemann. Oxford. EE.UU. 37-39 p.
- 7.29. Constitución Política de la República del Ecuador. (1998). Capítulo II: De los Derechos civiles y Políticos, artículo 23, numerales 6 y 20. Quito. Ecuador.
- 7.30. Cunningham, C., Philp, J. (2000) Comparison of Bioaugmentation and Bioestimulation in ex situ treatment of Diesel Contaminated Soil. Land Contamination and Reclamation. 8 (4): 261- 269.
- 7.31. Chaineau, C., H, Morel, & J. L. Oudot. (1995). Microbial degradation in soil and water microcosmos of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings. Env. Sci. Technol. 29:1615-1621p.
- 7.32. De Lorenzo, V. (2002) Biorremediación: De la placa de petri al medio ambiente. Centro Nacional de Biotecnología. Caracas. Venezuela.
- 7.33. Díaz, L. (2001). Biodegradación in situ de hidrocarburos poliaromáticos con Pseudomonas aeruginosa y Bacillus cereus. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Venezuela.
- 7.34. Domínguez, V., García, L. (1999). Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el Oriente ecuatoriano. Petroproducción. Ecuador.

- 7.35. Dupontt, J. (2000). Resistencia a metales pesados y a antibióticos en cepas bacterianas biodegradadoras de antraceno aisladas de la playa “Caimare Chico”. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Venezuela.
- 7.36. Escalante, R. (2002). Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios. Universidad de Cali. Colombia.
- 7.37. Evans M., Fuchs J. (1988). Persistence of oiling in mussel beds after the Exxon Valdez oil spill. Marine Environmental Research 51 (2): 167-190 p.
- 7.38. Facchinello, M., García, C. y Massei, I. (2006). El Rumen – Mutualismo y los orígenes de la célula eucariota. UNCo-ESSA Microbiología Ambiental I. Extraído el 9 de septiembre, 2008 de: http://essa.uncoma.edu.ar/academica/materias/microbiologia/ambiental_I/seminarios_2006/IM_massei_5.pdf.
- 7.39. Fernández, P., M. Grifoll, A. M. Solanas, J. M. Bayona y J. Albaigés. (1992). Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. Environ. Sci. Technol. 26:817-829.
- 7.40. Foght, J. M., K. Semple, C. Gauthier, D. W. S. Westlake, S. Blenkinsopp, G. Sergy, Z. Wang y M. Fingas. (1998). Development of a standard bacterial consortium for laboratory efficacy testing of commercial freshwater oil spill bioremediation agents. Revista Microbiol. Biotechnol. 21:322-330p.
- 7.41. Fuenmayor, S. & V., Rodríguez. (1992). Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons degradative soil Pseudomonas. Acta Científica Venezolana 43: 349-354.
- 7.42. Gibson, D. T. y V. Subramanian. (1984). Microbial degradation of aromatic compounds. In: Gibson DT (Ed), *Microbial Degradation of Organics compounds*. Marcel Dekker, New York.

- 7.43. Govan J. & Deretic V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbial rev. 60:539-574p.
- 7.44. Gottschalk, G. (1986) Bacterial Metabolism. Nueva York. Quinta edición. Editorial Springer-Verlag. 260-265 p.
- 7.45. Grifoll, U., Ghazali, F., Salía, A., Sallehi R., y Basri, K. 1995. Biodegradation in soil by microbial consortium. Internat. Biodeter. Biodegr., 54: 61-67 p.
- 7.46. Hideki, K., Katsuyuki, U., Hisako, H., Horikoshi, K. (2000) Novel diesel elimination system in a tolerant microorganism. Journal of Bacteriology. 180: 6451-6455.
- 7.47. Hozumi, T., H. Tsutsumi, and M. Kono. (2000). Bioremediation on the shore after an oil spill from the Nakhodka in the sea of Japan. Chemistry and characteristics of heavy oil loaded on the Kakhodka and biodegradation tests by a bioremediation agent with microbiological cultures in the laboratory. Marine Poll.Bull. 40:308-314p.
- 7.48. Ingraham, J. L, Malone. (1983). Growth of the Bacterial Cell. Sunderland. Editorial Sinauer & Assoc. Inc. 746-753p.
- 7.49. Kanaly, R. & S., Harayama. (2000). Biodegradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. Journal of Bacteriology 182: 2059-2067.
- 7.50. Kaplan, R., Christopher L. (2004). Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. Appl Environ Microbiol. 70(3): 1777.1786.
- 7.51. Kastner, M., Breuer, M., Mahro, B. (1998) Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and survival of PAHdegrading Bacteria introduced into soil. Applied and Environmental Microbiology. 64(1): 359-362.

- 7.52. Kazunga, C., Nishimura, R., Aitken, M., (2000). Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1917-1922.
- 7.53. Komukai-Nakamura, S., K. Sugiura, Y. Yamauchi-Inomata, H. Toki, K. Venkateswaran, S. Yamamoto, H. Tanaka y S. Harayama. (1996). Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude. *J. Ferm. Bioeng.* 82:570-574.
- 7.54. Krieg, N. & J., Dobereiner. (1984). Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore. Editorial Williams & Wilkins, Co. 682-685p.
- 7.55. Kuehl, R.O. (2001) Diseño de experimentos: principios estadísticos del análisis y diseño de investigación. 2ª edición. Thompson Editores. México.
- 7.56. Lalucat, J. Cladera, A. Garcia, E. (2000). Biodegradación de crudo de petroleo en el mar: accidente del Prestige y aportaciones de la biotecnología ambiental. Departamento de biología, Universidad de les Illes Balears, Extraído el 15 de agosto, 2008, de [http:// www.semicro.es/Actualidad/SEM35_94.PDF](http://www.semicro.es/Actualidad/SEM35_94.PDF).
- 7.57. Leahy, J. & R, Colwell. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* 20: 30-315.
- 7.58. Lewis, D. L., H. P. Kollig & R. E. Hodson. (1986). Nutrient limitation and adaptation of microbial populations to chemical transformation. *Appl. Env. Microbiol.* 51:598-603.
- 7.59. Lindstrom, J. E., R. C. Prince, J. C. Clark, M. J. Grossmann & T. R. Yeager. (1991). Microbial populations and hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediments affected by the T/V Exxon Valdez oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2514-2522.

- 7.60. Madigan TM., Parker J. (2003). Brock-Biology of Microorganisms. Nueva York. Prentice Hall, Upper Saddle River. cap. 6. 354p.
- 7.61. Merino, P. (1998). Aislamiento y evaluación de microorganismos nativos productores de emulsificantes de petróleo. Universidad de Piura. Perú.
- 7.62. Morrison, R. & R. Boyd. (1998). Química Orgánica. Pearson Educación. Quinta Edición. Nueva York. EE.UU. 34-37, 566, 677, 1345p.
- 7.63. Murray, P.R., E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. 1995. Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C. Sexta edición. Editorial Tenover & R.H.Yolken. 510-515p.
- 7.64. Oliveira, C., Benedict, O., William, T. (2003). Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. Brazilian Journal Microbiology. 2003;34(1).
- 7.65. OMS-Organización Mundial de la Salud. (2003). Commission on Health and Environment. Report of the panel on environment and contamination. Geneva. Suiza.
- 7.66. Osorio, G. (2006), Microbiota Normal, Capítulo 5, Extraído el 23 de febrero, 2009 de, http://www.med.uchile.cl/apuntes/archivos/2006/medicina/capitulo_05_microbiota_normal.pdf
- 7.67. Parés, R. & A. Juárez. (1997) Bioquímica de los Microorganismos. Barcelona. Reverté. 263-267p.
- 7.68. Perkin-Elmer Corporation. (1987) Analytical Methods For Atomic Absorption Spectrophometry. Estados Unidos.
- 7.69. Petróleos de Venezuela PDVSA. (2006). Unidad de Biotecnología del Petróleo. Banco de Microorganismos autóctonos. Caracas. Venezuela.

- 7.70. Plaza, G., Otero, M., Torres, N., Velásquez, M., Corbalan, E., Rodríguez, T. (2001). Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos. Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente.5: 163-167.
- 7.71. Prescott, L., Harley P., Klein M. (2004) Microbiología. Madrid. Quinta edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 533-534p.
- 7.72. Prince, R. C. (1993) Petroleum spill bioremediation in marine environments. Crit. Rev. Microbiol. 19, 217-242.
- 7.73. Ray, B. (2001). Fundamental Food Microbiology, 2ª ed. CRC Press, Londres.
- 7.74. Restrepo, R. (2002). Derrame de hidrocarburos. Impacto en los ecosistemas tropicales. Petroproducción. Ecuador.
- 7.75. Reynolds, J. (2005). Lab procedures manual, the gram stain. Richland College. Extraído el 21 de Noviembre, 2007, de http://www.rlc.dcccd.edu/mathscience/reynolds/micro/lab_manual/gram.html.
- 7.76. Rivera, M., Ferrera, R., Volke, V., Rodríguez, R., Linares, L. (2000). Adaptación y Selección de Microorganismos Autóctonos en Medios de Cultivos Enriquecidos con Petróleo Crudo. Terra. 20: 423-434.
- 7.77. Rodríguez, C. (2001). Manual y técnicas de cultivo microbiológico. 2º edición. La Habana: BIOCEN, p.200.
- 7.78. Rojas, N., Martínez, J., Zermeño, L., Rodríguez, R. (2003). Levels of polychlorinated Biphenyls in Mexican Soils and Their Biodegradation using bioaugmentation. Environmental contamination and toxicology. 70:63-70.
- 7.79. Rose A.H. (1977). Microbiología química. Madrid. 3º edición. Editorial Alhambra. Cap. 3, 275p.

- 7.80. Ruales, M. (2005). Selección y aislamiento de bacterias degradadoras de petróleo en el Oriente ecuatoriano. Laboratorios QMAX. Ecuador.
- 7.81. Ruales, M. (2006). Adaptación de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Serratia rubidea* compuestos derivados de petróleo. Laboratorios QMAX. Ecuador.
- 7.82. Saier MH. (1997). Peter Mitchell and his chemiosmotic theories. ASM News 63 (1) 13-21p.
- 7.83. SAS, 1998. SAS User's Guide: Statistics. Release 6.03 Ed. SAS Institute Incorporation, Cary, NC, EE.UU. 1028p.
- 7.84. Soto, L. (2001). Influencia de las relaciones bacterianas interespecíficas en el proceso de biodesulfuración de hidrocarburos aromáticos. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela. 132 p.
- 7.85. Steel, R. & J. Torrie. (1988). Bioestadística: principios y procedimientos. México. 2da edición. McGrawHill. 274-283p.
- 7.86. Sugiura, K., M. Ishira, T Shimauchi & S. Harayama. (1997). Physicochemical properties and biodegradability of Crude Oil. EE.UU. Environmental Science & Technology. 31:45-51.
- 7.87. Tyler G. (2000) Ecología y Medio Ambiente. España. Grupo Editorial Iberoamérica. Mc Graw Hill – Interamericana. 149-171p.
- 7.88. Todar, Kenneth, (2000). Environmental Researches with *Pseudomonas aeruginosa*. Universidad del departamento de Wisconsin-Madison de bacteriología. Wisconsin. Estados Unidos.
- 7.89. Téllez, J., & Valderrama, B. (2000) Microbiología del petróleo y sus derivados. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. México.

- 7.90. Umbreit, W. (1982). Método de los pozos por halos de inhibición. Modern Microbiology. WH Freeman & Co. San Francisco. EE.UU. 189-193 p.
- 7.91. UMMS, (2000). Genética de Microorganismos, Capítulo V, Extraído el 14 de junio, 2008, de:
<http://www.umss.edu.bo/epubs/etexts/downloads/29/cap5,2.htm>.
- 7.92. Van Hamme, J., A., Sing & O., Ward. (2003). Recent advances in petroleum Microbiology. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67:503-549.
- 7.93. Venkateswaran, S., Yamamoto, H., Tanaka y S. Harayama. (1995). Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude. *J. Ferm. Bioeng.* 82:570-574 p.
- 7.94. Viñas, M. (2005), Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica, Facultad de Biología, Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona, Extraído el 23 de julio, 2008, de
http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0920105-085623//TESIS_MVI%DIAS_CANALS.pdf
- 7.95. Wick L., N. Pasche, S., Bernasconi, O., Pelz & H., Harms. (2003). Characterization of multiple-substrate utilization by anthracene-degrading *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 69:6133-6142.
- 7.96. Williams, E., M., Alteken & O., Pelz. (1995). Competitive metabolism of naphthalene, metylnaphthalene and fluorine by phenanthrene-degrading *Pseudomonas*. Appl. Environ. Microbiol 61: 357-362p.
- 7.97. Zamudio S., Francisco J.; Arturo A. Alvarado S. (1996). Análisis de diseños experimentales con igual número de submuestras. México: Universidad Autónoma Chapingo. 83 p.