

Fernando Abasolo Pacheco  
Laura Aracely Morante Carriel

---

Bacterias degradadoras de hidrocarburos a partir de  
suelos contaminados con hidrocarburos

---



## **FERNANDO ABASOLO PACHECO**

**Biólogo graduado en la Universidad Autónoma de Puebla, Maestría y Doctorado en Ciencias en el uso manejo y preservación de los recursos naturales, con orientación en Acuicultura, en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, México. Línea de trabajo orientada al uso de alternativas eficientes y ecológicas para disminuir el uso de sustancias químicas tóxicas en acuicultura y agronomía. En este sentido, ha desarrollado trabajos relacionados con la selección y caracterización in vitro de microorganismos con potencial probiótico en acuicultura y el uso de homeopatía en acuicultura y agricultura, con la finalidad de optimizar los recursos animales y vegetales. Ha participado y dirigido proyectos científicos tecnológicos CONACyT-ProInnova, SEP-CONACyT en México y FOCICYT en Ecuador. Es co-inventor de tres patentes relacionadas con el uso de la homeopatía en acuicultura y agricultura. Ha publicado artículos científicos y participado como evaluador en revistas de alto impacto. Ha participado en la dirección de tesis de pregrado y posgrado. Es docente de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UTEQ y miembro del Sistema Nacional de Investigadores (SNI), con distinción como investigador Nivel 1 por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, en México. En México funge como Director de Planeación y Desarrollo de la empresa BIO-ARCADIA Consultores Ambientales e Investigación S.C.**

## **LAURA ARACELY MORANTE CARRIEL**

**Laura Aracely Morante Carriel es Estudiante del Doctorado de Ciencias Agroalimentarias y Medio Ambiente, con calificación sobresaliente por la Universidad de la Frontera (Chile). Es Master en Gestión Ambiental por la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (Ecuador). Es investigadora del Laboratorio de Agroecología y Sustentabilidad Alimentaria en el Departamento de Ciencias Agronómicas y Recursos Naturales. Trabaja como tesista en el Proyecto titulado áreas verdes residenciales en un gradiente urbano-rural: impactos en servicios ambientales relacionados al bienestar humano.**

**Cuenta con algunos artículos científicos en revistas indexadas de impacto internacional. Bacterias con potencialidades para la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados de Quevedo, Ecuador. Study of the Productive Behavior of Var-21 Soya (Glycine max (L.) Merrill) under the Application of Organic Fertilizers. Metalosato de zinc en respuesta agronómica y composición química del pasto mombaza en la Amazonía Ecuatoriana. Isolation and characterization of bacteria, and their potential for bioremediation of pesticides in soils. Journal of Basic Microbiology. He sido becario de Doctorado por la Universidad de la Frontera (Chile). Actualmente soy miembro de la Red Chilena de Polinización.**

Fernando Abasolo Pacheco  
Laura Aracely Morante Carriel

Bacterias degradadoras de hidrocarburos a partir de  
suelos contaminados con hidrocarburos



Bacterias degradadoras de hidrocarburos a partir de  
suelos contaminados con hidrocarburos

Fernando Abasolo Pacheco  
Laura Aracely Morante Carriel

Docente Universidad Técnica Estatal de Quevedo

Bacterias degradadoras de hidrocarburos a partir de  
suelos contaminados con hidrocarburos

Editado por Colloquium  
ISBN: 978-9942-814-33-3  
Primera edición 2019

© Universidad Técnica Estatal de Quevedo  
© Colloquium

La obra fue revisada por pares académicos antes de su proceso editorial, en caso de requerir certificación debe solicitarla a:  
sbores@colloquium-editorial.com

Quedan rigurosamente prohibidas, bajo las sanciones en las leyes, la producción o almacenamiento total o parcial de la presente publicación, incluyendo el diseño de la portada, así como la transmisión de la misma por cualquiera de sus medios, tanto si es electrónico, como químico, mecánico, óptico, de grabación o bien de fotocopia, sin la autorización de los titulares del copyright.

Ecuador 2019

## **PROLOGO**

El estudio de la diversidad microbiana y de la dinámica de sus poblaciones en consorcios biodegradadores, está creciendo notablemente en la ecología microbiana, permitiendo profundizar en el conocimiento acerca de la composición de las comunidades presentes en suelos contaminados, así como su evolución durante los procesos de biodegradación, para determinar cuáles son los microorganismos capaces de adaptarse y de explorar los hábitats contaminados.

Los contenidos presentados en la investigación “BACTERIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS A PARTIR DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS EN EL CANTÓN QUEVEDO, AÑO 2017” exponen un trabajo investigativo de tipo experimental apoyado por información de artículos científicos relacionados a la degradación de hidrocarburos como agentes de biorremediación.

Este trabajo diversifica las opciones con el aislamiento de bacterias de uso para el suelo y con el paso de los años la recuperación de los recursos contaminados. Esto permite neutralizar las sustancias tóxicas, ya sea transformándolas en sustancias menos tóxicas o haciéndolas inofensivas para el medio ambiente y la salud humana.

Además, expone la existencia de bacterias capaces de adaptarse y ser empleadas como única fuente de consumo de hidrocarburos, haciendo factible la descomposición de los mismos. Observando diferencias significativas en el desarrollo bacteriano y adaptabilidad, reduciendo el contenido de hidrocarburos.

Fabricio Canchignia Martínez, Ph.D

## ÍNDICE

PROLOGO.....	7
ÍNDICE.....	9
INTRODUCCIÓN .....	11
Cepa bacteriana .....	18
Obtener un cultivo puro .....	19
Bacteria .....	20
Hidrocarburo .....	23
Petróleo .....	25
Suelo .....	28
Biodegradación .....	31
Pseudomonas aeruginosa.....	32
Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo.....	33
Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. ....	34
Caracterización microbiológica en suelos contaminados por hidrocarburos, de tipo Pseudomonas. ....	37
Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros. ....	38
Purificación de las cepas con capacidad para biodegradar fracciones de petróleo. ....	40
Determinación de la capacidad degradadora de hidrocarburos en condiciones <i>in vitro</i> a 24 horas.....	43
Bibliografía .....	46

## INTRODUCCIÓN

Muchos de los sistemas de descontaminación se basan en la digestión de sustancias orgánicas por empleo de microorganismos, quienes obtienen la fuente de carbono necesaria para el crecimiento de sus células y una fuente de energía para llevar a cabo todas las funciones metabólicas que necesitan sus células para su crecimiento. Para que estos procesos metabólicos se lleven a cabo, y puedan ser utilizados como una técnica remediativa, será necesario que existan en el medio unas condiciones fisico-químicas óptimas (Maroto y Rogel, 2005).

Normalmente, los procesos de remediación del suelo no permiten tratar gran parte de la mezcla crudo-suelo dentro de una estación y reinyectarlo a la producción, demandando así de su transporte hasta sitios seguros (explanadas) para su descontaminación. En dichos sitios se emplean dos técnicas fundamentales para el tratamiento del suelo: compostaje y landfarming, cuya selección dependerá de factores como: precipitación, suelo y maquinarias (Bustamante, 2007).

En el Ecuador, la remediación por medio de compostaje se la efectúa en grandes pilas que son removidas con maquinaria, a fin de que inyectar oxígeno a la mezcla. En el caso del landfarming, las pilas son de menor tamaño y la oxigenación es estática. Para el caso de ambos procedimientos se agrega a la mezcla cultivos de microorganismos y moléculas producidas en el laboratorio, tales

como: hongos, bacterias, moho, enzimas, levaduras y demás organismos vivos; de esta forma se contribuye a la aceleración del proceso de degradación de los componentes hidrocarburíferos presentes en el suelo contaminado (Cuvi & Bejarano, 2015).

En nuestro país, las bacterias son los microorganismos más utilizados en la remediación de suelos contaminados con petróleo. Estos organismos vivos son recolectados en campo, especialmente en escenarios de antiguos derrames o en sitios adyacentes; posteriormente son analizadas en laboratorio (identificación de taxones) y ubicadas en cajas Petri junto a mezclas de crudo, para luego proceder a la evaluación de su capacidad degradadora. La presencia de un halo de inhibición se traduce en la capacidad de la bacteria para consumir hidrocarburos (Cuvi & Bejarano, 2015).

La biorremediación se caracteriza por acelerar los procesos biodegradativos ocurridos de forma natural en los ecosistemas. En los suelos contaminados las comunidades microbianas presentan un dominio por parte de aquellos organismos capaces de sobrevivir a los compuestos tóxicos. Sin embargo, cuando dicho dominio es efectuado por parte de las bacterias Gram negativas, por ejemplo: *Pseudomonas aeruginosa*, éstas tienden a ejercer un dominio en el sistema, de modo que, el conocimiento procedente de los biomarcadores lipídicos se restringen al estado nutricional o fisiológico de la comunidad bacteriana más que a su diversidad (Díez, 2011).

Generalmente, los dispersantes químicos empleados en la remediación de suelos contaminados con petróleo, suelen ser más perjudiciales que el propio derrame de crudo, debido a su toxicidad y recalcitrancia a la biodegradación. Es así que, se ha desarrollado una alternativa emergente denominada biorremediación, la misma que permite el aprovechar la capacidad metabólica de los microorganismos, sistemas biológicos y plantas para la degradación y biotransformación de los contaminantes (Pérez, Camacho, Gómez, Ábalos, & Cantero, 2008).

El estudio de la diversidad microbiana y la dinámica de sus poblaciones en consorcios biodegradadores, ha crecido notablemente en el campo de la ecología microbiana, permitiendo así profundizar en el conocimiento de la composición de las comunidades presentes en suelos contaminados, así como su evolución durante los procesos de biodegradación. Esto ha permitido determinar los microorganismos capaces de adaptarse y de explorar los hábitats contaminados (Torvisk, Ovreas, & Thingstad, 2003). Sin embargo, la mayor parte de los microorganismos presentes en muestras ambientales no pueden cultivarse en el laboratorio (un 0,1 a un 0,01 % son cultivables) y los que son cultivables pueden no ser representativos de la población presente en la muestra (DeLong, 2004).

El presente trabajo tiene como finalidad aislar e identificar cepas bacterianas con capacidad para biodegradar fracciones de petróleo

y seleccionar la de mayor capacidad biodegradadora como una alternativa para la solución de los problemas de contaminación generados por la industria petrolera ecuatoriana. En este sentido, resulta fundamental indagar de la forma más representativa posible acerca de las poblaciones microbianas presentes en el suelo contaminado con crudo.

## **INTRODUCCIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN**

Los desechos de aceites generados por las lubricadoras están compuestos por elementos pesados (hidrocarburos) estos se constituyen en un riesgo constante para el medio ambiente, principalmente para el recurso suelo, el cual puede verse seriamente afectado por estas sustancias químicas presentes en el crudo. Esta es la situación, de la mayor parte de la contaminación de los desechos industriales y desechos de aceites automotriz en el país, los cuales han contribuido sustancialmente a la contaminación del suelo, del sector agrícola de Los Ríos convirtiendo al recurso en poco apto para las actividades productivas.

La investigación desarrolló en la ciudad de Quevedo, Ecuador, donde se realizaron la toma de muestras de los residuos de lubricadoras y sus desechos que son emitidos por las gasolineras, talleres automotrices y lubricadoras que afectan al recurso suelo y agua. Las respectivas coordenadas geográficas son 01o 01" de latitud sur y 79o 47" de longitud occidental, ubicada a una altura de 73msnm.

En el Ecuador, la utilización de tecnología obsoleta y el débil control institucional a lubricadoras han contribuido a la constante aceleración de los niveles de contaminación del suelo y agua, como

producto de los desechos generados a los cambios de aceites del parque automotor de Quevedo. Estos desechos no mantienen un programa de control de guías prácticas para el Manejo Ambiental de Lubricadoras y Gasolineras, estos derrames de hidrocarburos afectan severamente a las características físicas, químicas y biológicas del suelo y agua, traduciéndose así en un deterioro progresivo del recurso y consecuentemente en la disminución de su capacidad productiva y afectando a la salud humana.

Normalmente, las tecnologías y técnicas de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos son muy costosas y difíciles de aplicar, por lo cual se requiere de un conocimiento previo del acontecimiento (derrame), y posteriormente inducir el procedimiento de restitución que más se adapte a las condiciones del medio contaminado. Es importante mencionar que las técnicas de remediación del suelo no garantizan una recuperación inmediata e integral del recurso, ya que existen ciertas características del recurso que requieren de procesos naturales y un tiempo prudencial para su restitución total.

La industria petroquímica es importante en toda sociedad, no obstante, la falta de un programa de protección ambiental hace que el medio se vuelva más frágil ante el impacto ambiental ocasionado por los desechos generados por las gasolineras, lubricadoras y mecánicas. Estos desechos son descargados en los efluentes del

Río Quevedo que ocasionan daño al sistema de agrícola empleado para el sistema de riego al sector bananero.

Se ha estudiado, mediante técnicas moleculares la estructura y composición de comunidades microbianas asociadas a ambientes contaminados por crudos de petróleo; el uso de estas técnicas provee una apreciación clara de varias características importantes de las comunidades, específicamente la biomasa viable, la estructura de la comunidad y el estado nutricional o la presencia de respuestas a estrés en bacterias Gram negativas.

La selección de microorganismos a través de pruebas sucesivas de crecimiento poblacional en cultivos puros ricos en petróleo, es una estrategia eficiente para evaluar la adaptación y supervivencia de cepas tolerantes a elevadas concentraciones de hidrocarburos. Los resultados de estas pruebas confirman la selección de las cepas más tolerantes y adaptadas, dependiendo de estas el éxito en las siguientes etapas de tratamiento tanto de suelos como de aguas contaminadas con aceites industriales.

El conocimiento científico acerca del papel que desempeñan los microorganismos en el tratamiento de agentes contaminantes del medio ambiente como los aceites, es esencial para prevenir y controlar los daños que puedan ocasionar los derrames o fugas de estos contaminantes. La degradación de hidrocarburos es un proceso que puede ocurrir de forma natural por los microorganismos nativos de las zonas contaminadas

aprovechando sus rutas metabólicas. Por esta razón, en estos momentos se prevé que los microorganismos pueden ofrecer esta posibilidad en tecnologías basadas en el uso de estos en la remediación de la contaminación ambiental por petróleo y sus derivados.

La biorremediación no ha perdido vigencia, interés y pertinencia; por el contrario, la Constitución Política del Ecuador (2008), reconoce que “la naturaleza tiene derecho a la restauración” (Art. 72), por lo cual se puede estimar a la reparación del suelo como una política de Estado que es necesario cumplir.

### **CEPA BACTERIANA**

Población de células de una sola especie descendientes de una única célula, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias. De una manera más básica puede definirse como un conjunto de especies bacterianas que comparten, al menos, una característica (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2003).

Origen:

Una cepa bacteriana se deriva de un único microorganismo aislado en cultivo, y la cepa de referencia de una especie representa un ejemplo invariable de la especie en cuestión y es parte de una colección de cultivos (Koneman & Allen, 2008).

Identificación:

La identificación de una bacteria es su asignación a un taxón según una clasificación dada. Consiste en la determinación de las características fenotípicas y/o genotípicas y la comparación de estas características con los diferentes taxones de la clasificación considerada. Las características a determinar y su número depende principalmente del tipo de bacteria y del fin que se persigue en la identificación (Soler, 2003).

A continuación se propone un esquema de trabajo para la identificación de una cepa bacteriana desde el punto de vista bioquímico (Biotipo) (Núñez, Carrera, Fernández, Bell, & Michelena, 2012):

### **OBTENER UN CULTIVO PURO**

Examen microscópico de células vivas y de frotis teñido por coloración Gram. Se determina así la forma y el Gram del microorganismo en estudio. También es importante determinar la agrupación y la presencia de esporas y otras características morfológicas de interés.

Determinar las características nutricionales (en general se desprenden de los métodos empleados en el aislamiento y cultivo anteriores); fotoautótrofos, fotoheterótrofos, quimioautótrofos, quimioheterótrofos.

Pruebas primarias: En la siguiente tabla, modificada del Cowan & Steel's Manual of Identification of medical bacteria, se utilizan un

grupo de pruebas, denominadas pruebas primarias, con las cuales se puede determinar el género, grupo de géneros o en algún caso familia a la que pertenece un aislamiento. Las pruebas primarias son: Gram, morfología, catalasa, oxidasa, OF, fermentación de glucosa, esporas, crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis y movilidad.

Pruebas secundarias y terciarias a efectos de llegar a especie: Estas dependerán del género o familia determinado. (ejemplo: producción de pigmentos, producción de indol a partir de triptofano, producción de coagulasa, de fenilalanina deaminasa, etc.)

## **BACTERIA**

Las bacterias son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (por lo general entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$  de longitud) y diversas formas, incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrio) y hélices (espirilos). Las bacterias, son células procariotas, por lo que a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, hongos, etc.) (Stanier, Ingraham, Wheelis, & Painter, 1996).

Funciones:

En general, las bacterias descomponen los substratos de fácil uso, los compuestos de carbono simple tales como las exudaciones de las raíces y los residuos frescos de las plantas. Los desechos producidos por las bacterias se convierten en materia orgánica

(Arroyave, 2004). Tienen los mecanismos productores de energía y el material genético necesarios para su desarrollo y crecimiento (Pírez, 2006).

Tamaño:

El tamaño de las bacterias oscila entre las 0.5 y 3  $\mu\text{m}$ , pudiendo llegar en algunos tipos a 10  $\mu\text{m}$ . Las bacterias de interés médico tienen un tamaño entre 0.4 y 2  $\mu\text{m}$ . Solo son visibles entonces, al microscopio óptico o microscopio electrónico. Para observarlas con el microscopio óptico se usa el objetivo de inmersión (100X), sumergiendo esta lente en una gota de aceite (aceite de inmersión) en el preparado a observar. A modo comparativo, una célula eucariota mide más de 5  $\mu\text{m}$  (un eritrocito tiene un diámetro de 7 $\mu\text{m}$ ), mientras que un reovirus mide menos de 0.1 $\mu\text{m}$ . Su tamaño pequeño determina una relación entre la superficie y el volumen elevada, con alta tasa metabólica (Pírez, 2006).

Morfología:

Microscópica: La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Básicamente, se diferencian según su forma en cocos (esférica u ovalada), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral); dentro de estas últimas se encuentran: *Treponema*, *Borrelia* y *Leptospira* (Pírez, 2006).

Macroscópica: La mayoría de las bacterias se multiplican rápidamente y son visibles como colonias cuando se las siembra en medios de cultivo sólidos adecuados. Requieren una incubación de aproximadamente 24 horas en una atmósfera que favorezca su desarrollo, a temperatura óptima. Existen excepciones como *M. tuberculosis*, que requiere para su desarrollo de dos a ocho semanas de incubación (Pírez, 2006).

Estructura:

Las diferentes estructuras bacterianas las podemos dividir, según sean constantes en las células o no, en estructuras permanentes o variables. Dentro de las primeras se destaca: la pared celular, la membrana celular, los ribosomas y el material genético. Las estructuras variables son: los flagelos, las fimbrias o pilis, la cápsula y los esporos (Pírez, 2006).

Estructuras variables, son aquellos que existen en algunas bacterias pero no en todas; un mismo grupo bacteriano o una misma cepa bacteriana las puede presentar o no, dependiendo de las condiciones en donde se desarrolle. Las estructuras variables no resultan esenciales para la vida de la bacteria (Vargas & Kuno, 2014).

Además, podemos clasificar las estructuras bacterianas en internas o citoplásmicas y externas o de la envoltura celular. Dentro de las internas destacamos el material genético, los ribosomas y los cuerpos de inclusión. La envoltura celular engloba la membrana

plasmática, la pared celular que la recubre, la cápsula y los apéndices como fimbrias o pilis y flagelos. Contiene los sitios de transporte para nutrientes, interviene en la relación huésped parásito, es blanco de las reacciones del sistema inmune y puede contener estructuras tóxicas para el huésped (Vargas & Kuno, 2014).

## **HIDROCARBURO**

Los hidrocarburos son compuesto orgánicos que solo contienen los elementos químicos: carbono e hidrógeno. Generalmente, se dividen en dos grandes grupos: hidrocarburos saturados e insaturados (alquenos, alquinos e hidrocarburos aromáticos) (Andrés, Antón, & Barrio, 2008).

Composición:

Indica claramente los elementos que se combinan para formar estas sustancias: carbono e hidrógeno. Los átomos de carbono tienen una especial capacidad para unirse entre si formando grandes cadenas, anillos y otros modelos complicados en el espacio. La forma y tamaño de la molécula queda determinada por la disposición de los átomos de carbono, de la que hay muchas posibilidades (Atkins & Jones, 2006).

Clasificación:

Hidrocarburos saturados: Se caracterizan porque todos los enlaces del carbono son covalentes simples. Responden a la fórmula

general:  $C_n H_{2n+2}$  donde  $n=1, 2, 3$  [...] Los hidrocarburos pueden constar de una cadena simple o tener diversas ramificaciones, por lo que para nombrar las cadenas laterales se introduce el concepto radical, que representa a la agrupación que resulta de romper un enlace covalente de un compuesto orgánico, de forma que cada resto contiene su electrón de enlace. Así:  $CH_3 - CH_3 \rightarrow CH_3 - \cdot - \cdot - CH_3$ . Los radicales procedentes de un hidrocarburo saturado se designan mediante la letra R o R' y se nombran cambiando la terminación -ano del hidrocarburo por -ilo o -il (Andrés, Antón, & Barrio, 2008).

Alquenos u olefinas: Son hidrocarburos que tienen al menos un doble enlace entre dos átomos de carbono y responden a la fórmula general  $C_n H_{2n}$  donde  $n= 2, 3, 4$  [...] Se debe localizar el doble enlace numerando los carbonos comenzando por el extremo más próximo al doble enlace. El número del carbono que lleva el doble enlace se sitúa delante del nombre del hidrocarburo. Si existen dos o más enlaces dobles, se habla de dieno, trieno. etc. Si la cadena es ramificada, se toma como cadena principal la más larga entre las que contienen el doble o dobles enlaces (Antón & Andrés, 2016).

Alquinos o acetilénicos: Son hidrocarburos que tienen como mínimo un triple enlace entre dos átomos de carbono, Su fórmula general es:  $C_n H_{2n-2}$  donde  $n= 2, 3, 4$  [...] Si existen dos o más enlaces triples, se habla de diino, triino. Si existen en la cadena conjuntamente dobles y triples enlaces. Se nombran primero los

dobles y luego los triples enlaces. Los alquenos y los alquinos son compuestos más reactivos que los alcanos debido a la existencia del doble o del triple enlace carbono-carbono. La reacción típica de estos compuestos es la reacción de adición al doble o al triple enlace. Como reactivos que se adicionan al doble o al triple enlace, se pueden citar el hidrógeno, los halógenos o el bromuro de hidrógeno (Antón & Andrés, 2016).

Aromáticos: Se llaman así porque los primeros compuestos de esta serie tienen olores agradables, característicos y fuertes (vainilla, canela, etc.). El principal hidrocarburo de esta serie es el benceno, de fórmula molecular  $C_6H_6$ . Los hidrocarburos aromáticos son compuestos muy estables y muchos de ellos, como el benceno, son excelentes disolventes no polares de sustancias como aceites y grasas. La existencia de dobles enlaces alternados o conjugados es lo que confiere a la molécula del hidrocarburo aromático su estabilidad especial. Que hace que no manifiesten las propiedades típicas de un alqueno (Antón & Andrés, 2016).

## **PETRÓLEO**

El petróleo (del griego: πετρέλαιον, lit. «aceite de roca»), es una mezcla de compuestos orgánicos, principalmente hidrocarburos insolubles en agua. También es conocido como petróleo crudo o simplemente crudo. También se le conoce como oro negro (Atkins & Jones, 2006).

Origen y formación:

El petróleo es de origen fósil, fruto de la transformación de materia orgánica procedente de zooplancton y algas que, depositados en grandes cantidades en fondos anóxicos de mares o zonas lacustres del pasado geológico, fueron posteriormente enterrados bajo pesadas capas de sedimentos. Se originaron a partir de restos de plantas y microorganismos enterrados durante millones de años y sujetos a distintos procesos físicos y químicos (Pinedo, 2005).

La transformación química (craqueo natural) debida al calor y a la presión durante la diagénesis produce, en sucesivas etapas, desde betún a hidrocarburos cada vez más ligeros (líquidos y gaseosos). Estos productos ascienden hacia la superficie, por su menor densidad, gracias a la porosidad de las rocas sedimentarias. Cuando se dan las circunstancias geológicas que impiden dicho ascenso (trampas petrolíferas como rocas impermeables, estructuras anticlinales, márgenes de diapiros salinos, etc.) se forman entonces los yacimientos petrolíferos (Lluch, 2012).

Composición:

El petróleo es un líquido oleoso bituminoso (color oscuro) de origen natural compuesto por diferentes sustancias orgánicas (es una mezcla de hidrocarburos, aunque también suelen contener unos pocos compuestos de azufre y de oxígeno). También recibe los nombres de petróleo crudo, crudo petrolífero o simplemente "crudo". Aunque se trata de un líquido aceitoso de color oscuro, es

considerado una roca sedimentaria. En una mezcla muy compleja de composición variable, de hidrocarburos de muchos puntos de ebullición y estados sólido, líquido y gaseoso, que se disuelven unos en otros para formar una solución de viscosidad variable (Lluch, 2012).

Esquema de una bomba para extracción de petróleo.

Hidrocarburos saturados o parafinas. Se los considera derivados del metano, su fórmula general es  $C_nH_{2n+2}$ .

Hidrocarburos etilénicos u oleifinas. Moléculas lineales o ramificadas que contienen un enlace doble de carbono ( $-C=C-$ ). Su fórmula general es  $C_nH_{2n}$ . Tienen terminación "-eno".

Hidrocarburos acetilénicos. Moléculas lineales o ramificadas que contienen un enlace triple de carbono. Su fórmula general es:  $C_nH_{2n-2}$ . Tienen terminación "-ino".

Hidrocarburos cíclicos ciclánicos. Hidrocarburos cíclicos saturados, derivados del ciclopropano ( $C_3H_6$ ) y del ciclohexano ( $C_6H_{12}$ ). Muchos de estos hidrocarburos contienen grupos metilo en contacto con cadenas parafínicas ramificadas. Su fórmula general es  $C_nH_{2n}$ .

Hidrocarburos bencénicos o aromáticos.

Compuestos oxigenados (derivados de hidrocarburos etilénicos, por oxidación y polimerización)

Compuestos sulfurados (tiofeno, etc.)

Compuestos nitrogenados cíclicos (piridina, etc.).

## **SUELO**

Es una capa delgada que se ha formado muy lentamente, a través de los siglos, con la desintegración de las rocas superficiales por la acción del agua, los cambios de temperatura y el viento. Las plantas y animales que crecen y mueren dentro y sobre el suelo son descompuestos por los microorganismos, transformados en materia orgánica y mezclados con el suelo (Labrador, 2016).

Características:

El suelo posee características físicas, químicas y biológicas (Ruiz & Molina, 2010):

Físicas: la textura, determinada por la proporción de partículas minerales de diverso tamaño presentes en el suelo; la estructura, es la forma en que las partículas se juntan para formar agregados; la densidad, se refiere a la cantidad de masa por unidad de volumen del suelo; la temperatura, esta influye en la distribución de la vegetación; el color, depende de sus componentes y varia con la cantidad de humedad.

Químicas: la capacidad de intercambio, corresponde a la capacidad del complejo arcilla humus de ceder nutrientes a las plantas por intermedio de la captación de partículas minerales; la fertilidad, se refiere a los nutrientes que están a disposición de las

plantas; el pH, indica la acidez, la neutralidad o alcalinidad del suelo.

Biológicas: la materia orgánica de los suelos es el producto de la descomposición química de las excreciones de animales y microorganismos, de residuos de plantas o de la degradación de cualquiera de ellos tras su muerte.

Propiedades físicas:

Textura: Es la proporción en la que se encuentran distribuidas variadas partículas elementales que pueden conformar un sustrato. Según sea el tamaño, porosidad o absorción del agua en la partícula del suelo o sustrato, se clasifica en: la arena, el limo y las arcillas.

Estructura del suelo: La estructura del suelo se define por la forma en que se agrupan las partículas individuales de arena, limo y arcilla. Cuando las partículas individuales se agrupan, toman el aspecto de partículas mayores y se denominan agregados (FAO, 2013).

Consistencia del suelo: Es la firmeza con que se unen los materiales que lo componen o la resistencia de los suelos a la deformación y la ruptura. La consistencia del suelo se mide por muestras de suelo mojado, húmedo y seco. En los suelos mojados, se expresa como adhesividad y plasticidad, tal como se define infra. La consistencia del suelo puede estimarse en el campo mediante ensayos sencillos, o medirse con mayor exactitud en el laboratorio (Ramírez, 2013).

Porosidad del suelo: Es el porcentaje de espacios vacíos con respecto a la totalidad del volumen del suelo (sólidos + poros); e incluye poros grandes donde se ubica el aire y poros medianos donde se retiene el agua. Los poros en el suelo se encuentran relacionados con el arreglo de los componentes primarios del suelo (modelos de enraizamiento) u otro proceso de formación del suelo, como agrietamiento, desplazamiento y percolación (FAO, 2010).

Densidad: Es el peso que tiene el suelo por unidad de volumen; sin embargo, por ser un cuerpo poroso se considera la masa de las partículas sólidas, únicamente cuando se tiene la densidad real, pero si se considera su organización, entonces nos referiremos a su densidad aparente. Se estima que la densidad real varía entre 2,6 a 2,7g/cc para todos los suelos; mientras que la densidad aparente obedece del grado de holgura del suelo y por lo tanto es una valoración más versátil que depende de: textura, materia orgánica y la estructura del suelo (Veas, 2015).

Propiedades químicas del suelo:

Capacidad de intercambio catiónico: La Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) es una medida de cantidad de cargas negativas presentes en las superficies de los minerales y componentes orgánicos del suelo (arcilla, materia orgánica o sustancias húmicas) y representa la cantidad de cationes que las superficies pueden retener (Ca, Mg, Na, K, NH<sub>4</sub> etc.)

Potencial de hidrógeno: El pH determina el grado de adsorción de iones (H<sup>+</sup>) por las partículas del suelo e indica si un suelo está ácido o alcalino. Es el indicador principal en la disponibilidad de nutrientes para las plantas, influyendo en la solubilidad, movilidad, disponibilidad y de otros constituyentes y contaminantes inorgánicos presentes en el suelo (Villamil, 2015).

Saturación de bases: En el suelo se encuentran los cationes ácidos (hidrógeno y aluminio) y los básicos (calcio, magnesio, potasio y sodio). La fracción de los cationes básicos que ocupan posiciones en los coloides del suelo se refiere al porcentaje de saturación de bases (Saravia, 2010).

Salinización: Es la acumulación de sales solubles en agua en el suelo. Las sales que se pueden encontrar en un nivel freático salino se transportan con el agua a la superficie del suelo mediante ascenso capilar y una vez que el agua se evapora se acumulan en la superficie del suelo (Saravia, 2010).

## **BIODEGRADACIÓN**

La biodegradación es la característica de algunas sustancias químicas de poder ser utilizadas como sustrato por microorganismos, que las emplean para producir energía (por respiración celular) y crear otras sustancias como aminoácidos, nuevos tejidos y nuevos organismos. Puede emplearse en la eliminación de ciertos contaminantes como los desechos orgánicos urbanos, papel, hidrocarburos, etc.

No obstante en vertidos que presenten materia biodegradable estos tratamientos pueden no ser efectivos si nos encontramos con otras sustancias como metales pesados, o si el medio tiene un pH extremo. En estos casos se hace necesario un tratamiento previo que deje el vertido en unas condiciones en la que las bacterias puedan realizar su función a una velocidad aceptable (Atkins & Jones, 2006).

### **PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

*Pseudomonas aeruginosa* es una especie de bacterias Gram-negativas, aeróbicas, con motilidad unipolar. Es un patógeno oportunista en humanos y también en plantas. Es a menudo identificada, de modo preliminar, por su apariencia perlada y olor a uvas in vitro. La identificación clínica definitiva de *P. aeruginosa* frecuentemente incluye, tanto identificar la producción de piocianina y fluoresceína como determinar su habilidad de crecer a 42 °C. *P. aeruginosa* es capaz de crecer en combustibles como queroseno o gasóleo, ya que es un microorganismo capaz de nutrirse a partir de hidrocarburos, causando estragos de corrosión microbiana, y creando una gelatina oscura que a veces se identifica inadecuadamente con un alga (Martinez, 2004).

**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE UNA CEPA BACTERIANA  
DEGRADADORA DE HIDROCARBUROS A PARTIR DE SUELOS  
CONTAMINADOS CON PETRÓLEO.**

El estudio permitió evaluar la biodegradación de petróleo por cepas aisladas de suelos contaminados con petróleo, mediante un aislamiento realizado por enriquecimiento secuencial utilizando petróleo Mesa 30/Puerto escondido (80:20) como única fuente de carbono y energía. Monitoreo: las muestras fueron tomadas de suelos contaminados con petróleo en los alrededores del reservorio del sistema de tratamiento de residuos en la Refinería del Petróleo “Hermanos Díaz” en Santiago de Cuba, las cuales fueron conservadas en frascos ámbar estériles y procesados dentro de las 24 h de su colecta. Metodología: se aislaron 9 cepas bacterianas, cinco Gram negativas y cuatro Gram positivas, que fueron identificadas según el Manual Bergey’s, 1994. Las pruebas bioquímicas evaluadas confirmaron que las cepas aisladas AT14, AT15, AT16, AT17 y AT18 corresponden a *Pseudomonas aeruginosa*. Resultados: se seleccionó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* AT18, por mostrar mayor crecimiento sobre petróleo como única fuente de carbono y energía al obtenerse 1,83 g/L de biomasa celular, lo que representa un 57 % de biodegradación de petróleo (Pérez, Camacho, Gómez, Ábalos, & Cantero, 2008).

## **BIOREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS DERIVADOS DEL PETRÓLEO.**

En la presente revisión se analiza la biorremediación como una alternativa, saludable, frente al deterioro progresivo de la calidad del medio ambiente por el derramamiento de crudos en Colombia. Efectos sobre el suelo: en el suelo los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos como evaporación y penetración, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida puede ser más o menos lentos, ocasionando una mayor toxicidad, además, de tener una moderada, alta o extrema salinidad, dificultando su tratamiento. Altos gradientes de salinidad pueden destruir la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células, lo cual es letal para muchos microorganismos usados como biorremediadores (Benavides, y otros, 2006).

Fuentes de contaminación: lodos de perforación de tipo inversa y recortes, estos lodos contienen un tipo de aceite muy similar a diésel en concentraciones de aproximadamente 10% y son sumamente arcillosos; suelo contaminado por derrames de tuberías corroídas, existen campos petroleros con alrededor de cincuenta de 50 años de antigüedad, ubicados en zonas pantanosas, manglares u otras selvas inúndales; tiraderos de

desechos aceitosos semisólidos, se utilizan pozos que nunca produjeron petróleo o un pozo antiguo que no produce y está tapado, puesto que nunca fueron diseñados para dicho fin y son contruidos de materiales impermeables. Resultados: la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* ha sido identificada como degradadora de gran cantidad de sustratos como el n-hexadecano, mineralización de compuestos alifáticos en condiciones anaerobias, y degradadora de hidrocarburos aromáticos y poli aromáticos, así como del pireno en estudios in vitro (Benavides, y otros, 2006).

Degradación de n-alcanos por *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 (Barranquilla, Colombia - 2008).

El estudio tuvo la finalidad de determinar la capacidad de *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 para la degradación de n-alcanos. Método: Utilización de alcanos; determinación de 16 alcanos puros, esterilización a 121 °C y 15 Lb de presión durante un lapso de 15 minutos, adición de 2,0 ml/L de una solución  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1M y 100  $\mu$ l/L de  $CaCl_2$  1M. Los cultivos para la determinación de alcanos se realizaron en matraces con 50 ml del medio mineral M9 con 1% de los alcanos puros y un inóculo 500  $\mu$ l de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* MGP-I, con un rango de turbiedad de 200-300 UK. La incubación se la realizó a temperatura ambiente con agitación de 150 rpm. El crecimiento se midió determinando las UK medidas en un fotocolorímetro Klett con filtro azul a diferentes tiempos. Cuantificación de n-alcanos por

cromatografía de gases; selección del solvente para la extracción de las fases orgánicas de los cultivos mediante la utilización de benceno, diclorometano, tetracloruro, tolueno y los alcanos C: 16 24 30 40. (Salgado, Pineda, Mesta, Díaz, & Wang, 2008).

Degradación de n-alcanos; esta se efectuó en cultivo por lote y duplicado. Previo a la etapa estacionaria de crecimiento se extrajo la fase orgánica tres veces en un embudo de separación con diclorometano a los cultivos con C11 y hasta C24, y con benceno a los que tenían de C30 hasta C40. Las fases orgánicas fueron colectadas en matraces y deshidratadas pasándolas a través de un papel filtro Wathman 1 con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Después se concentraron las muestras por destilación con un rotovapor. Para analizar las fases orgánicas residuales se inyectó 1 µl de la fase orgánica en un cromatógrafo de gases. Análisis estadístico: los resultados de degradación fueron sometidos a análisis estadístico de Varianza (ANOVA), empleando una distribución tipo normal con el software GLIM versión 3.77. Resultados: se obtuvo que la rapidez de degradación de dichos compuestos disminuye conforme la cadena hidrocarbonada aumenta o disminuye alrededor de C20. La remoción de los n-alcanos por *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 es directamente proporcional al crecimiento de la bacteria (Salgado, Pineda, Mesta, Díaz, & Wang, 2008).

## **CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA EN SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS, DE TIPO PSEUDOMONAS.**

La investigación se basó en la caracterización microbiológica en suelos contaminados por hidrocarburos a fin de identificar obtener cepas con características biorremediadoras obtenidas a partir de colonias aisladas en muestras de lodo-suelo contaminadas por hidrocarburos. Metodología: Condiciones del sitio de estudio; la investigación se desarrolló en el sector Río Bonanza, perteneciente a la provincia de Pastaza, zona central de la región amazónica, estimación de condiciones climatológicas (precipitación, temperatura, ETP) sistema hídrico y vías de acceso. Recolección de muestras; se lo efectuó de acuerdo con el Protocolo ISO 10381-6:1993 (Maposita, Calle, Fiallos, & Burgos, 2011).

Identificación de bacterias aerobias, hongos, levaduras y bacterias degradadoras; se pesaron 15g de suelo y se colocó la muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, se agregó 100 ml de medio Solanas. Se agregó entre 5-10 gotas de tween 80 para la homogenización, Se incubo a 150 rpm durante 30 minutos, con el sobrante se realizaron diluciones seriadas en solución salina hasta  $10^{-8}$ . En estas diluciones se procedió a tomar el sobrenadante (solución madre) y de ahí se realizó  $10^{-2}$   $10^{-4}$  (disoluciones), de cada dilución se retiró 1 ml por cada uno y se sembró en placas por duplicado en medio Agar Triptona soya para el conteo de las

bacterias aerobias totales. Las diluciones fueron cultivadas en placas con Agar petróleo para el conteo total de bacterias degradadoras. Luego se efectuaron las inoculaciones (Maposita, Calle, Fiallos, & Burgos, 2011).

Aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos; fueron sembradas en medio Agar Triptona soya, luego fueron incubadas durante 24 horas a temperatura de 37 °C, para la caracterización morfológica se empleó la tinción de Gram. Caracterización de las cepas degradadoras; fue aplicada para los hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Resultados: las bacterias con capacidad de biodegradar petróleo fueron agrupadas en el siguiente orden: *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia rubidae*, *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Brevibacterium* sp., *Spirillum* sp., *Xanthomonas*, *Alcaligenes* sp; estas se caracterizan por transformar los hidrocarburos en sustancias menos tóxicas (Maposita, Calle, Fiallos, & Burgos, 2011).

### **AISLAMIENTO DE BACTERIAS POTENCIALMENTE DEGRADORAS DE PETRÓLEO EN HÁBITATS DE ECOSISTEMAS COSTEROS.**

En esta investigación se aislaron bacterias de 4 hábitats en el ecosistema marino aledaño a una industria petroquímica en la Bahía de Cartagena Colombia. Metodología: las muestras fueron sometidas a pre-enriquecimiento por una semana, a enriquecimiento por tres semanas y a un proceso de selección de

cepas competitivas, lo cual permitió evidenciar los cambios marcados en las propiedades del crudo de petróleo, como en turbidez y agregados blancos por crecimiento bacteriano. Se aislaron diferentes morfotipos que al caracterizar bioquímicamente fueron identificados como *Pseudomonas aeruginosa* en todas las muestras, corroborando su gran capacidad de adaptación en ambientes contaminados de este tipo. Resultados: las permutas obtenidas permitirán en el futuro realizar pruebas de biodegradación con esta bacteria y desarrollar ensayos a nivel microcosmos para su uso potencial en procesos de biorremediación (Echeverri, Manjarrez, & Cabrera, 2011).

Comparación de eficiencia entre *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*, y su masificación para la remediación de hidrocarburos totales de petróleo en los pasivos ambientales de AQ-Lab en Puerto Francisco de Orellana (2016).

La finalidad del estudio fue evaluar la eficiencia de degradación de hidrocarburos totales de petróleo, entre *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*, y su masificación para la remediación de pasivos ambientales mediante técnica de Landfarming en AqLab en Puerto Francisco de Orellana. Metodología de la investigación: se comparó la eficiencia en 12 cajas experimentales, dos blancos fueron codificados con 1 y 2, las 10 restantes divididas en: 1a, 1b, 1c, 1d y 1e con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC mientras que 2a, 2b, 2c, 2d, y 2e con *Pseudomonas putida* ATCC, mediante análisis

de laboratorio tomando en cuenta los parámetros: pH, temperatura y humedad. Se obtuvo que en las cajas 1a y 2e mostraron una eficiencia de 89,8% mientras que la 2c fue del 94%. Para la degradación del hidrocarburo se masificó e inoculó la *Pseudomona putida* en el suelo patrón incitando el tratamiento con la técnica de Landfarming, con lo cual se consiguió una degradación de 132 630,66 mg/kg a 2400 mg/kg. Resultados: estadísticamente la bacteria *Pseudomona putida* es más eficiente que *Pseudomona aeruginosa*, sin embargo, al comparar con ANOVA de un factor independiente, las eficiencias son estadísticamente iguales. Se recomienda que para próximas investigaciones se realice la comparación con especies diferentes (Bastidas & Cedeño, 2016).

### **PURIFICACIÓN DE LAS CEPAS CON CAPACIDAD PARA BIODEGRADAR FRACCIONES DE PETRÓLEO.**

Las muestras de suelo, agua y al derrame de crudo de petróleo, fueron el punto de partida para la selección de bacterias descomponedores de hidrocarburos. Estos inóculos permitió la obtención de una sinergia de crecimiento bacteriano en los Erlenmeyer con 100 ml de cultivo, donde se observa una abundancia de colonias bacterianas a los 5 días, procediendo al muestreo de 100 uL del cultivo bacteriano, incubado en un nuevo de cultivo para su selección. Este procedimiento se lo realizó tres veces desde la matriz inicial para incentivar a la selección de bacterias descomponedores de hidrocarburos. Cabe resaltar la

presencia de bacterias como consorcio bacteriano no específico en degradación de hidrocarburos. La purificación selectiva de las bacterias descomponedoras se lo realizó por selección a tolerancia al medio de cultivo del hidrocarburo el aceite automotriz, observado a los 15 días, con la presencia de bacterias en el Erlenmeyer con el medio de cultivo King B + el hidrocarburo industrial (Figura 1).

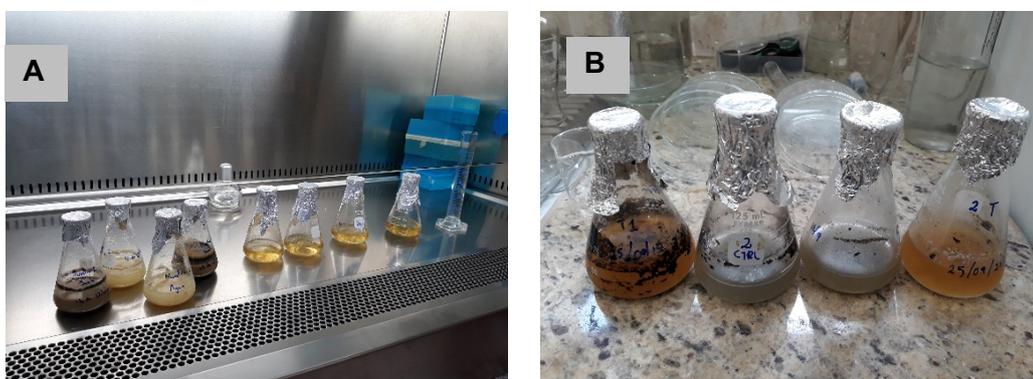


Figura 1. Aislamiento y purificación de bacterias con capacidad biodegradación de hidrocarburos. A, Muestras de suelo, agua y crudo de petróleo a 5 días de incubación con el medio de cultivo. B, La generación de bacterias con tolerancia al hidrocarburo por 15 días, de las muestras de suelo, agua y crudo de petróleo

#### 4. Aislamiento y selección de bacterias descomponedoras de hidrocarburos.

Del consorcio bacteriano generado a los 15 días en el medio de cultivo King + hidrocarburo, se recuperó 5 uL, donde esta muestra

fue diluida en 1/10000000. La muestra fue inoculada en placas Petri con el medio solido King-B, para el rescate y selectividad de colonias bacterianas (Figura 2).



Figura 2. Selección de bacterias en medio King-B provenientes del cultivo líquido después de 15 días en hidrocarburos.

Selección de 15 colonias bacterianas, para su procedencia de agua, suelo y muestras al derrame de crudo de petróleo detallado en la Tabla 1. Se procedió a clasificar en las colonias bacterianas Gram positivas.

Tabla 1. Colonias bacterianas con tolerancia a hidrocarburos

<b>Zona de muestras</b>	<b>Codificación</b>
Suelo contaminado con hidrocarburo	SRP-1/5
Suelo contaminado con hidrocarburo	SRP-1/7
Suelo contaminado con hidrocarburo	SRP-1/8
Suelo contaminado con hidrocarburo	SRP-1/9
Suelo contaminado con hidrocarburo	SRP-1/10
Suelo contaminado con hidrocarburo	SRP-1/12
Agua contaminado con hidrocarburo	ARP-2/1
Agua contaminado con hidrocarburo	ARP-2/2
Agua contaminado con hidrocarburo	ARP-2/3
Agua contaminado con hidrocarburo	ARP-2/4
Agua contaminado con hidrocarburo	ARP-2/5
Agua contaminado con hidrocarburo	ARP-2/7
Agua contaminado con hidrocarburo	ARP-2/8
Agua contaminado con hidrocarburo	ARP-2/9
Derrame de crudo de petróleo	DRP-6/6

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DEGRADADORA DE HIDROCARBUROS EN  
CONDICIONES *IN VITRO* A 24 HORAS.**

La generación y selección de las 15 colonias bacterianas, se sometieron para medir la capacidad en degradación de los hidrocarburos y poder evaluar su efecto a nivel *in vitro*. Se observó a 24 horas de evaluación un sinergismo al crecimiento de las colonias bacterianas en hidrocarburos, verificando el mayor incremento a la formación de un halo bacteriano por la cepa proveniente de crudo de petróleo colonia ARP-2/1. De las muestras de agua contaminadas con hidrocarburos se visualizaron de crecimiento bacteriano para las colonias ARP (2/1, 2/2, 2/3), con un crecimiento superior a dos ml. Este modelo experimental permitió la selección de cuatro cepas bacterianas que se adaptaron

rápidamente a la presencia del hidrocarburo y la formación de avance y expansión superior a los 2 ml en diámetro.

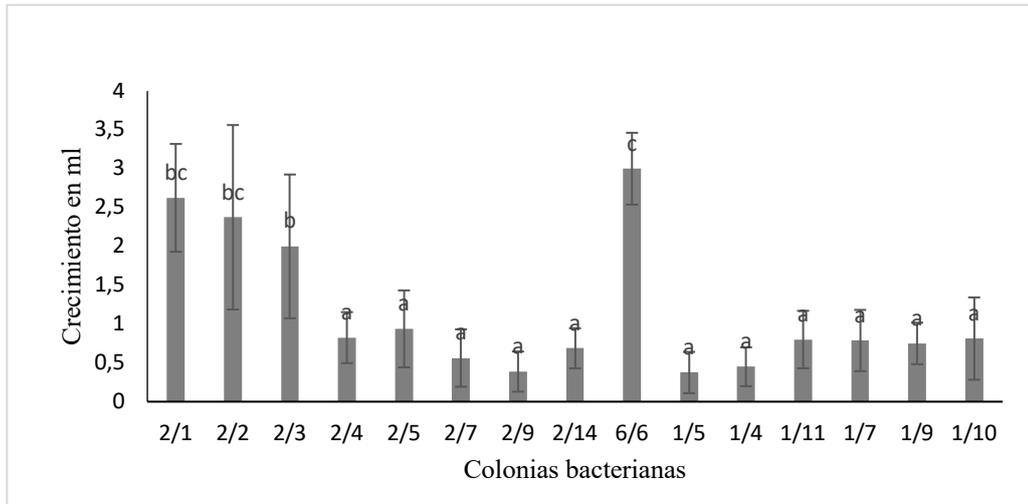


Figura 3. Crecimiento bacteriano en hidrocarburos por 24 horas. Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ( $P \leq 0.05$ ), por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Las barras indican el ES individual para tratamiento ( $\pm$ ).

La formación de crecimiento bacteriano nos confirma la capacidad que tiene las colonias de expandirse sobre la placa que contiene el hidrocarburo utilizándolo como fuente de energía para el crecimiento bacteriano. Esto se puede evidenciar claramente en la Figura 4, donde se aprecia la formación de colonias bacterianas alrededor de los discos de (0,5 cm Ø) que contenía la bacteria. Las cepas de mayor adaptabilidad al hidrocarburo resultaron ser de las

muestras provenientes de agua contaminada con hidrocarburos para la selección de las cepas ARP (2/1, 2/2, 2/3) y verificando muy poco crecimiento para la cepas provenientes de suelo contaminado con los hidrocarburos.

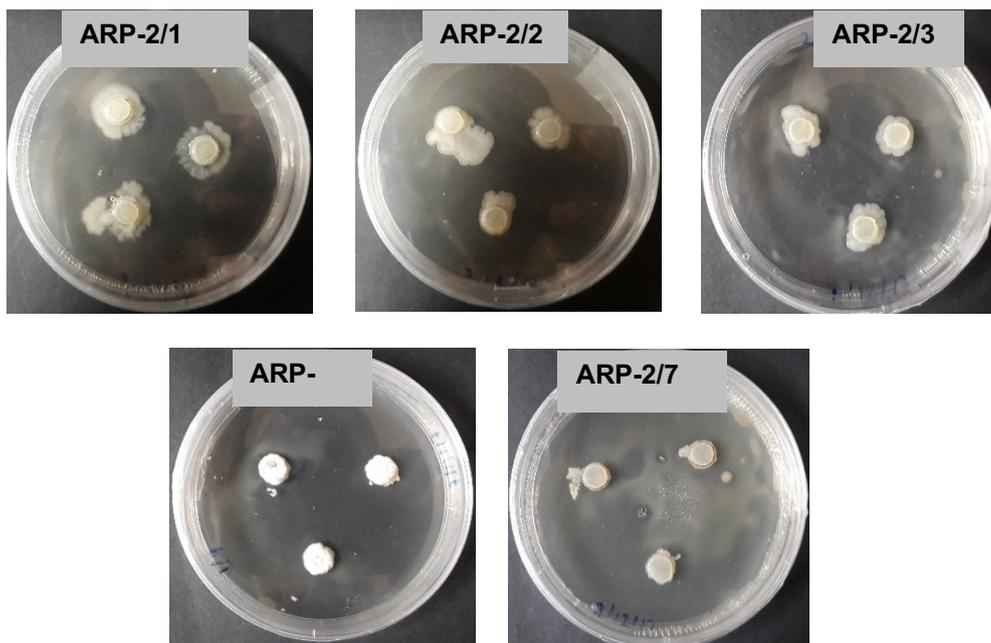


Figura 4. Formación de crecimiento bacteriano en hidrocarburo como única fuente de energía por 24 horas.

**Determinación de la capacidad degradadora de hidrocarburos en condiciones in vitro a 48 y 72 horas.**

La preselección de las bacterias mediante crecimiento y formación por 24 horas, se procedió a verificar la capacidad evolutiva del

avance a la descomposición del hidrocarburo al consumo como fuente de energía, que fue ejercido por la cepa ARP-2/1, con un diámetro de 10 mm Ø. También, se verifica un crecimiento intermedio por las bacterias ARP-2/2 y ARP-2/3 con un diámetro de crecimiento bacteriano entre 6 y 8 mm Ø. La aplicación de la bacteria control *B. subtilis* se observó un efecto mínimo al crecimiento bacteriano sobre el hidrocarburo.

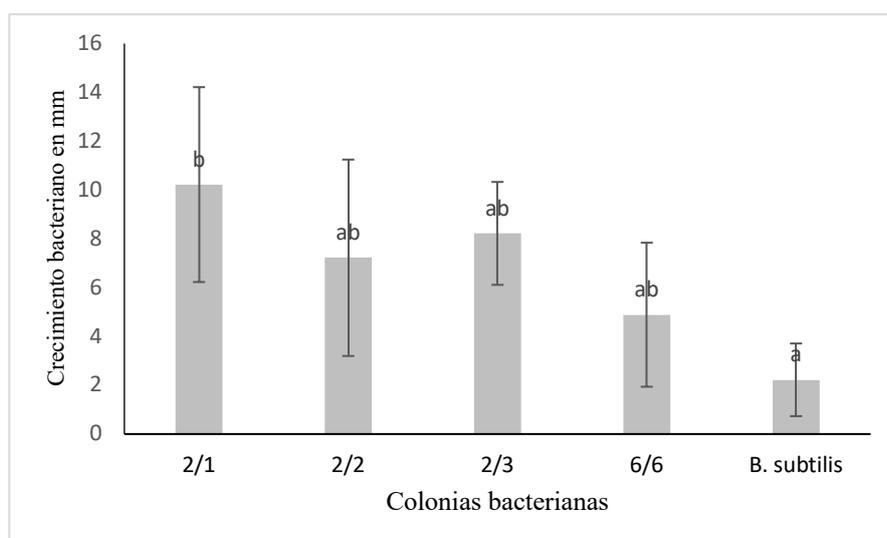


Figura 5. Capacidad degradadora de hidrocarburos en condiciones in vitro a 48 horas. Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ( $P \leq 0.05$ ), por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Las barras indican el ES individual para tratamiento ( $\pm$ ).

Los resultados reflejan el avance de la colonización bacteriana al consumo del hidrocarburo como única fuente de energía. Definiendo que las cepas ARP-2/1, ARP-2/2 y ARP-2/3 tienen un aumento progresivo a las 48 horas (Figura 6. A, B, C), a diferencia

de la cepa control *B. subtilis* que refleja un efecto repelente del hidrocarburo (Figura 6. E).

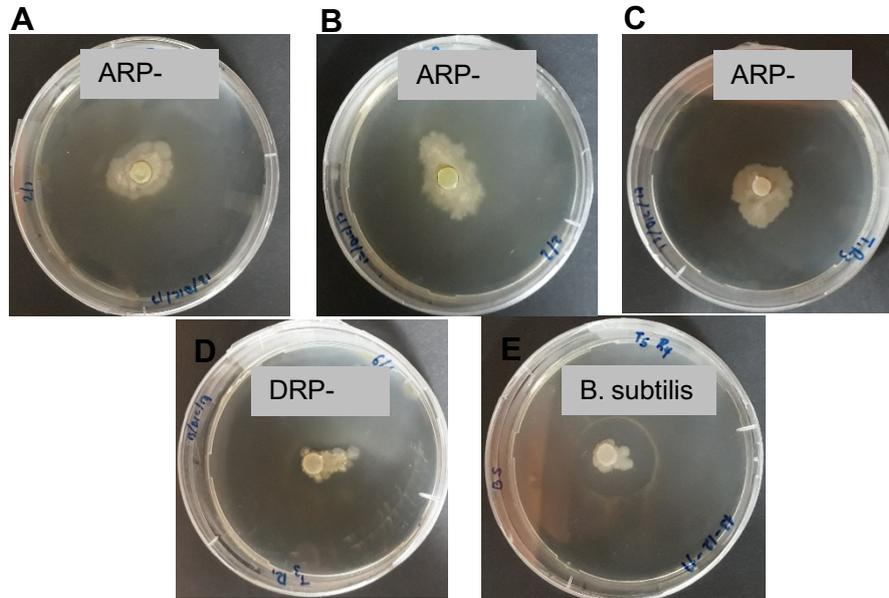


Figura 6. Capacidad degradadora de hidrocarburos como única fuente de energía por 48 horas.

La cepa control *B. subtilis* muestra un crecimiento mínimo de 3 mm de  $\emptyset$ . También se puede verificar un efecto repelente del hidrocarburo, donde es desplazado por la superficie del medio sólido constituido por agar agua (Figura 7). El crecimiento en diámetro por avance y colonización de la bacteria en la placa Petri con la única fuente de energía el hidrocarburo, se puede verificar la formación de colonias bacterianas por la cepa ARP-2/1, ARP-2/2 y ARP-2/3 alrededor del disco, con un incremento a desarrollo bacteriano de entre 11 y 12 mm  $\emptyset$ , esto evidencia la capacidad de adaptabilidad de la bacteria a este medio de cultivo, con capacidad de adaptabilidad de las bacterias a la degradación de hidrocarburos (Figura 8).

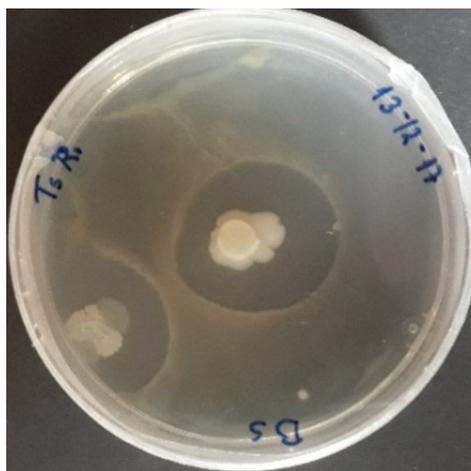


Figura 7. Disco bacteriano con *B. subtilis* desplazando el hidrocarburo a 72 horas.

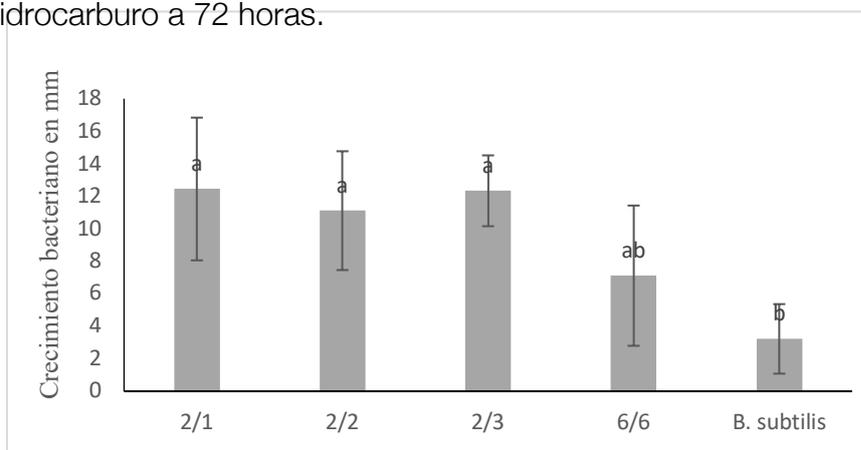


Figura 8. Capacidad degradadora de hidrocarburos en condiciones in vitro a 72 horas. Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ( $P \leq 0.05$ ), por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Las barras indican el ES individual para tratamiento ( $\pm$ ).

## **Relación fenotípica de las colonias bacterianas con capacidad degradadora de hidrocarburo.**

De las muestras con rastros de contaminación con hidrocarburos, de suelo, agua, derrame de petróleo, se realizó el rescate y selección de 15 colonias bacterianas, procediendo a la caracterización de los caracteres morfológicos. Donde 11 colonias bacterianas presentaron forma circular y tres de ellas con formular granular, para la elevación de las colonias se observó 12 colonias con esta característica, dos de elevación elevada y una de forma plana. Las colonias con el margen entero se observó para nueve de ellas y con margen ondulado seis. También se registraron datos bioquímicos para 15 colonias bacterianas y procediendo a realizar tinciones de Gram, que permite su clasificación. Obteniendo la verificación que las 15 colonias son Gram negativa y capacidad catalasa. Además, se evaluó la característica de emisión de fluorescencia observando para cuatro de las colonias bacterianas en (SRP-1/12, ARP-2/1, ARP-2/2 y DRP-6/6) (Tabla 2).



Tabla 2. Identificación de caracteres morfológica y bioquímica de las colonias bacterianas.

	Muestras	Tinción De Gram		Catalasa	Forma			Elevación			Margen			
		Positivo	Negativo		Circular	Filamentosa	Granular	Plana	Elevada	Convexa	Entera	Ondulada	Lobulada	Dentada
1	SRP-1/5	0	1	++	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
2	SRP-1/7	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
3	SRP-1/8	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
4	SRP-1/9	0	1	++	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
5	SRP-1/10	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
6	SRP-1/12	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
7	ARP-2/1	0	1	+	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
8	ARP-2/2	0	1	++	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
9	ARP-2/3	0	1	++	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
10	ARP-2/4	0	1	++	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
11	ARP-2/5	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
12	ARP-2/7	0	1	+	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
13	ARP-2/8	0	1	++	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
14	ARP-2/9	0	1	+	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
15	DRP-6/6	0	1	+	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0

La información generada por los caracteres morfológicos y bioquímicos de colonias bacterianas para formar un árbol de agrupamiento bajo estas características, permitiendo la generación del dendrograma con cuatro grupos. El Grupo A, reunió dos colonias bacterianas procedentes de muestras contaminadas de aguas y suelo con hidrocarburos (ARP-2/8 y ARP-2/9) y considerando dentro de este grupo a tres cepas con (SRP-1/10, SRP-1/5 y SRP-1/7), manteniendo en consideración que este grupo no mostraron capacidad degradadora del hidrocarburo al aceite mineral automotriz. El grupo B, están estrechamente relacionadas las cepas SRP-1/9 y SRP-2/7 carentes de crecimiento bacteriano en el hidrocarburo. También reunió una de las cepas procedentes de muestra de agua, con capacidad degradadora como es la colonia ARP-2/3. El grupo C, está conformado por dos cepas ARP-2/1 y ARP-2/2, con la mayor actividad degradadora observada en los experimentos. El grupo D, reúne a una de colonia bacteria la DRP-6/6 con capacidad degradadora, recuperada de muestras de derrames a crudo de petróleo. El resto de las cepas no presentaron capacidad de crecimiento bacteriano bajo la presencia del hidrocarburo.

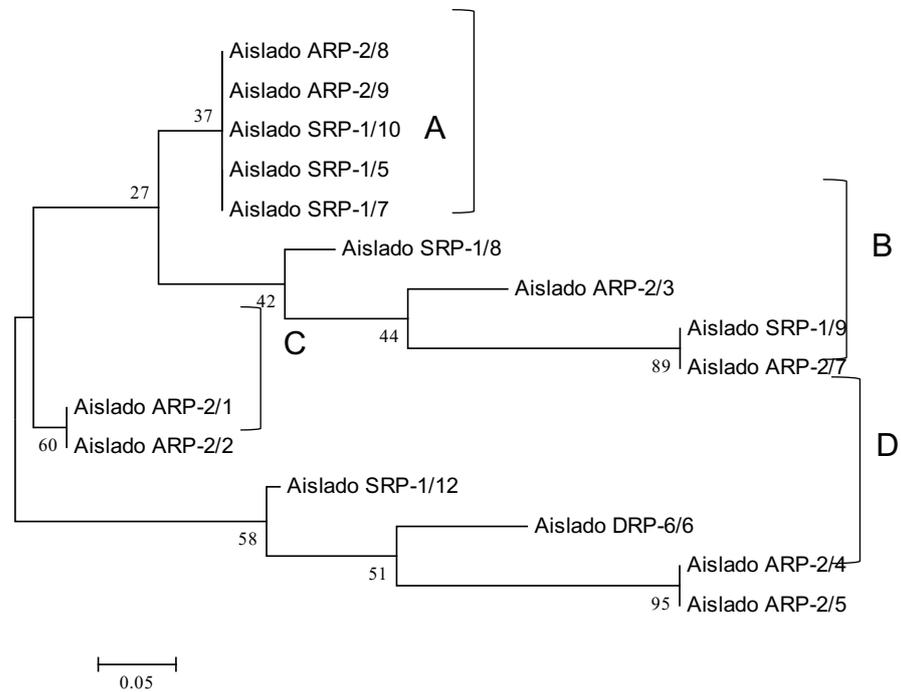


Figura 9. Relación filogenético de aislados nativos asociados a degradación de hidrocarburos. Dendrograma construido a datos de caracteres morfológicos y bioquímicos de muestras contaminadas con restos de hidrocarburos. La distancia evolutiva se dedujo empleando el método Neighbor-Joining. El árbol filogenético se construyó empleando Maximum Composite Likelihood. Los números representan porcentajes de bootstrap de (1000).

Las muestras de agua y suelo con trazas de hidrocarburos procedentes de lubricadoras favorecieron para la selección de colonias bacterias, también el empleo de muestra procedentes a derrame de crudo de petróleo fue de importancia para el rescate de bacterias. Se conoce que las bacterias son el grupo microbiano más versátil en la biodegradación de los hidrocarburos, con los 96 % aisladas de sustratos líquidos (lagos y ríos) estas bacterias presentan capacidad de crecer y emulsificar hidrocarburos derivados del petróleo (Dejonghe et al., 2002).

La estrategia de selección de bacterias con tolerancia a los hidrocarburos por el enriquecimiento secuencial, empleando como fuente de carbono y energía el crudo de petróleo demostró ser la correcta, por el incremento selectivo de colonias bacterianas y desarrolladas en Erlenmeyer bajo condiciones aeróbicas. Estudios a reportes de selección de bacterias en degradación de hidrocarburos aromáticos y n-alcános se han realizado bajo condiciones aeróbicas (Erickson et al., 1998).

La modalidad de selección de bacterias en medios líquidos y la presencia del hidrocarburo favoreció a la generación de biomasa microbiana, observando a los 15 días de incubación con el hidrocarburo el incremento de una microbiota específica para esta condición. Esto coincide con Pucci et al., (2010), ellos

demuestran que la aplicación de medio cultivos líquidos con la adición de hidrocarburos para la selección a una parte de la comunidad que tolera la presencia de estos y es capaz de emplear como fuente de carbono y energía.

El modelo de selección de las colonias bacterias con capacidad de crecer en hidrocarburos como única fuente de energía y carbono en medios sólidos, permitió la selección de las cepas bacterianas ARP (2/1, 2/2 y 2/3) y DRP (6/6), donde se observó un incremento de masa celular bacteriana de los 24 horas sobre la superficie del medio que contenía el aceite mineral automotriz. Esto coincide con Pérez et al., (2008), ellos demuestran el incremento de biomasa celular a las 24 horas donde inicia la primera fase de crecimiento, capaz de crecer sobre petróleo como única fuente de carbono y energía.

Los ensayos realizados en placas por las bacterias ARP (2/1, 2/2 y 2/3) y DRP (6/6) a 48 y 72 horas para la degradación del hidrocarburo, permitió afianzar la selección de estas cepas ya que se puede observar el incremento de su masa celular entre diámetros de 11 y 12 ml, esto se considera esencial y oportuno para verificar su capacidad de adaptación a compuestos aromáticos del petróleo. En trabajo de selección de bacterias degradadoras de hidrocarburos se observa el incremento de la masa celular bacteriana en placa con el mayor diámetro de 1 cm,

por efecto de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* AT18 Pérez et al., (2008).

El banco de cepas con 15 aislados bacterianos correspondió a Gram negativos, en trabajos de selección de bacterias con tolerancia a hidrocarburos en medios líquidos, estos microorganismos se adaptan más rápidamente a nuevas condiciones de cultivo y son generalmente Gram negativos (Atlas y Bartha, 2003). Dentro de las bacterias con mayor capacidad en degradación de hidrocarburos y resultaron ser positivas para catalasa corresponden ARP-2/1, ARP-2/2, ARP-2/3 y DRP-6/6. Las bacterias con respuesta a peróxido de hidrógeno se forman durante la reducción del di-oxígeno en agua. Estas especies pueden dañar las proteínas, lípidos y los ácidos nucleicos, por lo que se requieren sistemas antioxidantes eficientes (Mate et al., 1999).

Los ensayos de catalasas permiten diferenciar *Pseudomonas* spp. (oxidasa+) de otras especies de *Pseudomonas* y de otros bacilos gramnegativos (oxidasa-) (Mayz y Manzi, 2017). Cabe indicar que las bacterias que mostraron tener fluorescencia al ser cultivadas en el medio King B, corresponden para las cepas SRP-1/12 y las dos cepas con mayor capacidad degradadora del hidrocarburo ARP-2/1, ARP-2/2 y DRP-6/6 (Figura 10).

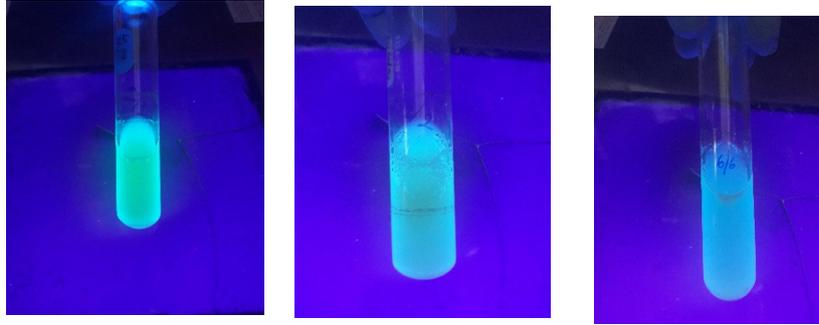


Figura 10. Presencia de la fluorescencia en el medio King B, por las cepas ARP-2/1, ARP-2/2 y DRP-6/6.

La familia Pseudomonadaceae, subgrupo de las fluorescentes, ya que producen pigmentos verde amarillentos solubles en agua (Langwaldt, K. and Puhakka J. 2000). La especie *P. aeruginosa*, se encuentra entre las de mayor resistencia a ambientes agresivos con capacidad nutricional para mineralizar gran variedad de hidrocarburos. Se describe con capacidades para degradar tanto compuestos alifáticos como aromáticos y poliaromáticos en condiciones aerobias, microaerófilas y desnitrificantes (Chayabatra and Ju, 2000).

Al finalizar con el trabajo de investigación nos permitió ejercer una selección específica para bacterias descomponedores de

hidrocarburos, el trabajo culmina con el agrupamiento por sus caracteres morfológico y bioquímicos, que corresponden a tener una afiliación genética en las cepas ARP-2/1, ARP-2/2, y mantendrían genes asociados en la degradación en derivados del petróleo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Álvarez, J., Fraiz, J., & De La Cruz, M. (2014). Gestión de la calidad: Motivaciones, barreras y beneficios. *Revista de Economía, Sociedad, Turismo y Medio Ambiente*, 1-94.

Álvarez, M. (2006). *Manual de Planeación Estratégica*. México, D.F.: Panorama Editorial.

Amato, C. (2015). *Relación entre sustentabilidad, responsabilidad social y responsabilidad extendida al productor*. Argentina: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Amaya, Ó. (2012). *El Desarrollo Sostenible y el Derecho Fundamental a Gozar de un Ambiente Sano*. Bogotá, Colombia: Universidad Externado de Colombia.

Andrés, D., Antón, J., & Barrio, J. (2008). *Física y Química 4 ESO*. Madrid, España: Editex.

Ángel, J. (2009). *Responsabilidad social y los principios del desarrollo sostenible como fundamentos teóricos de la información social de la empresa*. Madrid, España: ESIC Editorial.

Antón, J., & Andrés, D. (2016). *Física y Química 4º ESO (LOMCE)*. España: Editex.

Anton, S., & González, F. (2011). Planificación territorial del turismo. Barcelona, España: Editorial UOC.

Atkins, P., & Jones, L. (2006). Principios de química: los caminos del descubrimiento. México, D.F.: Ed. Médica Panamericana.

Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. (2003). Biología: la vida en la tierra. Barcelona, España: Pearson Educación.

Bastidas, J., & Cedeño, A. (2016). Comparación de eficiencia entre *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*, y su masificación para la remediación de hidrocarburos totales de petróleo en los pasivos ambientales de AQ-Lab en Puerto Francisco de Orellana. Riobamba, Ecuador: ESPOCH.

Benavides, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S., & Miranda, J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. NOVA - Publicación científica, 82-90.

Bustamante, T. (2007). Detrás de la cortina de humo: dinámicas sociales y petróleo en el Ecuador. Quito, Ecuador: Flacso-Sede Ecuador.

Cabo, J., & Herrero, J. (2014). Plan estratégico de gestión de las organizaciones sanitarias. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos.

Castells, X., & Bordas, S. (2012). *Energía, Agua, Medioambiente, territorialidad y Sostenibilidad*. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos.

Cuesta, U. (2012). *Planificación estratégica y creatividad*. Madrid, España: Esic Editorial.

Cuvi, N., & Bejarano, M. (2015). Los halos de inhibición en la remediación de suelos amazónicos contaminados con petróleo. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 1-35.

DeLong, E. (2004). Microbial population genomics and ecology: the road ahead. *Environment Microbiology*, 6, 875.

Díez, M. (2011). *Caracterización de la dispersión de contaminantes en la zona costera*. Barcelona, España: Universidad Politécnica de Cataluña.

Echeverri, G., Manjarrez, G., & Cabrera, M. (2011). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. *Revistas NOVA*, 76-86.

FAO. (2010). *Guía para la descripción de suelos*. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación.

FAO. (2010). *Indicadores para el desarrollo sostenible de la pesca de captura marina*. Roma, Italia: Food & Agriculture Org.

FAO. (20 de Julio de 2013). Estructura del suelo: definición e importancia del suelo. Obtenido de [ftp://ftp.fao.org/fi/CDrom/FAO\\_training/FAO\\_training/general/x6706s/x6706s07.htm](ftp://ftp.fao.org/fi/CDrom/FAO_training/FAO_training/general/x6706s/x6706s07.htm)

Fernández, J. (2006). Planificación estratégica de ciudades. Barcelona, España: Editorial Reverté S.A.

Galán, J., & Sáenz, A. (2012). Reflexiones sobre la responsabilidad social corporativa en el siglo XXI. Salamanca, España: Universidad de Salamanca.

Gómez, Domingo.; Gómez, María. (2013). Evaluacion de impacto ambiental (Tercera edición ed.). (S. Ediciones Nobel, Ed.) Madrid-España: Mundi-Prensa Libros.

Herce, M. (2010). Infraestructuras y medio ambiente: Urbanismo, territorio y redes de servicios. Barcelona, España: Editorial UOC.

Jonathan R. Barton, J. K. (2016). Santiago 2030: Escenarios para la planificación estratégica. Santiago de Chile: RIL Editores.

Koneman, E., & Allen, S. (2008). Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis. Madrid, España: Ed. Médica Panamericana.

Labrador, J. (7 de Noviembre de 2016). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Obtenido

de Manejo del Suelo: <http://www.fao.org/soils-portal/manejo-del-suelo/es/>

Lluch, J. (2012). Tecnología y margen de refino del petróleo. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos.

López, J., Robles, M., & De Pelekais, C. (2015). Planificación estratégica y bioseguridad: En los laboratorios de postlarvas de camarón. Madrid, España: EAE.

Luna, A. (2016). Plan estratégico de negocios. México D.F.: Grupo Editorial Patria.

Luna, A. (2016). Plan Estratégico de Negocios. México, D.F.: Grupo Editorial Patria.

Maposita, M., Calle, W., Fiallos, C., & Burgos, F. (2011). Caracterización microbiológica en suelos contaminados por hidrocarburos, de tipo *Pseudomonas* en el sector Río Bonanza, provincia de Pastaza. Guayaquil, Ecuador: ESPOL-CICYT.

Martinez, C. E. (2004). Salicylic acid regulates flowering time and links defense responses and reproductive development. *Plant J.*, 209-217.

Martínez, D., & Milla, A. (2012). Introducción al plan estratégico. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos.

Martínez, Daniel; Milla, Artemio. (2012). La elaboración del plan estratégico y su implantación a través del cuadro de mando integral. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos.

Matilla, K. (2009). Concepto fundamentales en la planificación estratégica de las relaciones públicas. Barcelona, España: Editorial UOC.

Montero, D., & Fernández, P. (2012). Calidad de vida, inclusión social y proceso de intervención. Bilbao, España: Universidad de Deusto.

Navarro, F. (2012). Responsabilidad social corporativa: teoría y práctica. Madrid, España: ESIC.

Núñez, A., Carrera, E., Fernández, M., Bell, A., & Michelena, G. (2012). Selección de una cepa bacteriana y un medio de cultivo industrial para la producción de poli 3-hidroxibutirato. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 49-54.

Paullier, J. (2012). Calidad de vida: Un constante aprendizaje. Uruguay: Penguin Random House Grupo Editorial Uruguay.

Pérez, R., Camacho, M., Gómez, J., Ábalos, A., & Cantero, D. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo . Revista CENIC Ciencias Biológicas, 44-50.

Pinedo, J. (2005). El petróleo en oro y negro. México: LibrosEnRed.

Pírez, M. (2006). Morfología y estructura bacteriana. Temas de bacteriología y virología médica.

Ramírez, F. (15 de Abril de 2013). Prezi.com. Obtenido de La consistencia del suelo: <https://prezi.com/k703pbxlldzg/untitled-prezi/>

Ramos, P. (2014). El hombre y el medio ambiente: EN El hombre y el medio ambiente: XIV Jornadas Ambientales. Salamanca, España: Ediciones Universidad de Salamanca.

Ruiz, A., & Molina, J. (2010). Automatización y telecontrol de sistemas de riego. Barcelona, España: Marcombo.

Sabalain, C. (2009). Introducción de conceptos básicos: El Medio ambiente y la estadística. Santiago de Chile, Chile: CEPAL.

Sainz, J. M. (2017). El Plan estratégico en la práctica. Madrid, España: Esic Editorial.

Sainz, José. (2017). El plan estratégico en la práctica. Madrid, España: Esic Editorial.

Salgado, R., Pineda, G., Mesta, A., Díaz, F., & Wang, E. T. (2008). Degradación de n-alcanos por *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1. *Revista Ciencia y Tecnología*, 123-132.

Saravia, B. (2010). Capacidad de intercambio cationico. Madrid, España: Academia.edu.

Soler, M. (2003). Evolución: la base de la biología. Granada, España: Proyecto Sur de Ediciones.

Strange, T., & Bayley, A. (2012). Desarrollo sostenible: Integrar la economía, la sociedad y el medio ambiente. México: Esenciales OCDE, OECD Publishing-Instituto de Investigaciones Económicas, UNAM.

Torvick, V., Ovreas, L., & Thingstad, T. (2003). Prokaryotic Diversity Magnitude, Dynamics and controlling Factors. *Science*, 296,1064.

Valdés, L. (2005). Planeación estrategica con enfoque sistematico. México D.F.: UNAM.

Vargas, T., & Kuno, A. (2014). Morfología bacteriana. *Revista de Actualización clínica*, 2594-2598.

Veas, L. (2015). Propuesta de uso alternativo del suelo a través de la determinación del índice de erosión potencial del cantón Quevedo aplicando sistemas de información grográfica. Quevedo, Ecuador: UTEQ-FCAMB.

Velásquez, C. (2012). Ciudad y desarrollo sostenible. Bogotá, Colombia: Universidad del Norte.

Villamil, P. (15 de Septiembre de 2015). SlideShare. Obtenido de Propiedades de los suelos: <http://es.slideshare.net/ingpaolavillamil15/propiedades-de-los-suelos-52823595>

ISBN: 978-9942-814-33-3



9 789942 814333