



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**  
**CARRERA INGENIERÍA BIOQUÍMICA**



---

**DETERMINACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA PRESENTE EN SUELOS  
CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS PARA USO POTENCIAL EN  
BIORREMEDIACIÓN**

---

*Trabajo de Investigación (Graduación), Modalidad: Trabajo Estructurado de Manera Independiente (TEMI) presentado como requisito previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.*

**Autor:** Tatiana Carolina Gavilánez Buñay

**Tutor:** Dr. Carlos Rodríguez M.; Ph.D

**Ambato - Ecuador**

**2013**

## APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del trabajo de investigación sobre el tema: **“DETERMINACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA PRESENTE EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS PARA USO POTENCIAL EN BIORREMEDIACIÓN”**, de la estudiante Tatiana Carolina Gavilánez Buñay alumna de la Carrera de Ingeniería Bioquímica, considero que dicho informe investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del Tribunal de Grado, que el Honorable Consejo Directivo Designe, para su correspondiente estudio y calificación.

Ambato, Febrero 2013

EL TUTOR

.....  
Dr. Carlos Rodríguez M.; Ph.D

## AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO

Los criterios emitidos en el trabajo de investigación: “**DETERMINACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA PRESENTE EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS PARA USO POTENCIAL EN BIORREMEDIACIÓN**”, como también los contenidos, ideas, análisis, conclusiones y propuesta son de exclusiva responsabilidad de mi persona, como autor de este trabajo de grado.

Ambato, Febrero 2013

EL AUTOR

.....  
Tatiana Carolina Gaviláñez Buñay

**APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

Los miembros del Tribunal Examinador aprueban el Informe de Investigación, sobre el tema: **“DETERMINACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA PRESENTE EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS PARA USO POTENCIAL EN BIORREMEDIACIÓN”**, de la estudiante: Tatiana Carolina Gavilánez Buñay.

Ambato, Marzo 2013

Para constancia firman:

---

Dr. Milton Ramos  
Miembro del Tribunal

---

Dr. Ramiro Velasteguí  
Miembro del Tribunal

---

Ing. Gladys Navas  
Presidenta del Tribunal

## **DEDICATORIA**

A la memoria de mi hermano Santiago que siempre fue quien impulsó mis estudios y me da las fuerzas para seguir adelante. Fuiste, eres y serás un ejemplo de superación, perseverancia y amor. Todo este trabajo te lo dedico a ti hermanito.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

### A. PÁGINAS PRELIMINARES

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| Tema                             | i   |
| Aprobación del Tutor             | ii  |
| Autoría                          | iii |
| Aprobación del Tribunal de Grado | iv  |
| Dedicatoria                      | v   |
| Índice general de contenidos     | vi  |
| Resumen                          | xix |
| Summary                          | xx  |

### B. TEXTO

#### CAPÍTULO I

##### EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| 1.1 Tema de investigación       | 1 |
| 1.2 Planteamiento del problema  | 1 |
| 1.2.1 Contextualización         | 1 |
| 1.2.2 Análisis crítico          | 3 |
| 1.2.2.1 Diagrama causa – efecto | 3 |
| 1.2.3. Prognosis                | 4 |
| 1.2.4 Formulación del problema  | 4 |

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| 1.2.5 Preguntas directrices | 4 |
| 1.2.6 Delimitación          | 4 |
| 1.3 Justificación           | 5 |
| 1.4 Objetivos               | 5 |
| 1.4.1 General               | 5 |
| 1.4.2 Específicos           | 6 |

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1 Antecedentes Investigativos                                                    | 7  |
| 2.1.1 Actividad petrolera en el Ecuador                                            | 7  |
| 2.1.2 Composición del petróleo                                                     | 8  |
| 2.1.3 Metabolismo de la degradación biológica de hidrocarburos                     | 9  |
| 2.1.3.1 Bases Bioquímicas                                                          | 10 |
| 2.1.3.2 Bases Genéticas                                                            | 10 |
| 2.1.4 Diversidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos                        | 11 |
| 2.1.5 Aislamiento selectivo de bacterias presentes en suelos contaminados con TPHs | 11 |
| 2.1.6 Aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos                       | 14 |
| 2.1.7 Biorremediación                                                              | 14 |
| 2.1.8 Taxonomía numérica                                                           | 15 |
| 2.2 Fundamentación Filosófica                                                      | 17 |
| 2.3 Fundamentación Legal                                                           | 18 |

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| 2.4 Categorías Fundamentales                   | 20 |
| 2.5 Hipótesis                                  | 21 |
| 2.5.1 Hipótesis nula ( $H_0$ )                 | 21 |
| 2.5.2 Hipótesis alternativa ( $H_1$ )          | 21 |
| 2.6 Señalamiento de variables de las hipótesis | 21 |

### **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1 Enfoque                                                                      | 22 |
| 3.2 Modalidad básica de la investigación                                         | 22 |
| 3.3. Nivel o tipo de investigación                                               | 22 |
| 3.4 Población y muestra                                                          | 22 |
| 3.5 Operacionalización de las variables                                          | 22 |
| 3.6 Recolección de información                                                   | 22 |
| 3.6.1 Caracterización físico-química de los suelos                               | 22 |
| 3.6.1.1 Contenido de humedad, materia orgánica y conductividad eléctrica.        | 22 |
| 3.6.1.2 pH                                                                       | 24 |
| 3.6.2 Determinación de la población y diversidad bacteriana                      | 24 |
| 3.6.3 Aislamiento, purificación y almacenamiento de los microorganismos aislados | 26 |
| 3.6.4 Caracterización macroscópica de los microorganismos                        | 26 |
| 3.6.5 Caracterización microscópica de los microorganismos                        | 27 |



|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| 3.6.5.1 Tinción de Gram                                              | 27 |
| 3.6.5.2 Tinción de endosporas                                        | 27 |
| 3.6.5.3 Tinción de cápsulas                                          | 27 |
| 3.6.6 Caracterización bioquímica y fisiológica de los aislamientos   | 28 |
| 3.6.6.1 Rango de crecimiento en función de la temperatura            | 28 |
| 3.6.6.2 Rango de crecimiento en función del pH                       | 28 |
| 3.6.6.3 Rango de crecimiento en función de la salinidad              | 29 |
| 3.6.6.4 Pruebas de crecimiento en función del hidrocarburo           | 30 |
| 3.7 Procesamiento y análisis                                         | 30 |
| 3.7.1 Determinación de la biodiversidad microbiana                   | 30 |
| 3.7.2 Población y diversidad de bacterias                            | 30 |
| 3.7.3 Formación de grupos de color de los microorganismos            | 32 |
| 3.7.4 Taxonomía numérica de datos fenotípicos de los microorganismos | 32 |

## **CAPÍTULO IV**

### **ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1 Análisis estadístico                                                         | 36 |
| 4.1.1 Caracterización físico-química de los suelos                               | 36 |
| 4.1.2 Aislamiento selectivo                                                      | 36 |
| 4.1.2.1 Determinación de la población y diversidad bacteriana                    | 36 |
| 4.1.3 Aislamiento, purificación y almacenamiento de los microorganismos aislados | 37 |

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.3.1 Aislamiento selectivo de bacterias a partir de suelo arenoso con 46.000 TPHs   | 38 |
| 4.1.3.2 Aislamiento selectivo de bacterias a partir de suelo arcilloso con 31.000 TPHs | 38 |
| 4.1.4 Caracterización macroscópica de los cultivos bacterianos                         | 38 |
| 4.1.5 Caracterización microscópica de los cultivos bacterianos                         | 38 |
| 4.1.6. Caracterización bioquímica y fisiológica de los aislamientos                    | 39 |
| 4.1.6.1 Rango de crecimiento en función de la temperatura                              | 39 |
| 4.1.6.2 Rango de crecimiento en función del pH                                         | 40 |
| 4.1.6.3 Rango de crecimiento en función de la salinidad                                | 40 |
| 4.1.6.4 Pruebas de crecimiento en función de hidrocarburos                             | 41 |
| 4.1.7 Taxonomía numérica de datos fenotípicos                                          | 41 |
| 4.2 Interpretación de Datos                                                            | 41 |
| 4.2.1. Población y diversidad bacteriana                                               | 41 |
| 4.2.2 Caracterización macroscópica                                                     | 42 |
| 4.2.3 Caracterización Fenotípica                                                       | 43 |
| 4.2.4 Pruebas Fisiológicas                                                             | 43 |
| 4.2.4.1 Rango de crecimiento en función de la temperatura                              | 43 |
| 4.2.4.2 Rango de crecimiento en función del pH                                         | 44 |
| 4.2.4.3 Rango de crecimiento en función de la salinidad                                | 44 |
| 4.2.4.4 Rango de crecimiento en función de hidrocarburos                               | 44 |
| 4.2.5. Taxonomía numérica de datos fenotípicos                                         | 45 |

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.6. Discusión general del trabajo investigativo                                                                           | 45 |
| 4.3 Verificación de Hipótesis                                                                                                | 47 |
| 4.3.1 Hipótesis para la determinación de la biodiversidad de bacterias presentes<br>en suelos contaminados con hidrocarburos | 47 |
| 4.3.1.1 Hipótesis nula (H0)                                                                                                  | 47 |
| 4.3.1.2 Hipótesis alternante (H1)                                                                                            | 47 |

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

|                     |    |
|---------------------|----|
| 5.1 Conclusiones    | 48 |
| 5.2 Recomendaciones | 49 |

## **CAPÍTULO VI**

### **PROPUESTA**

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 6.1 Datos informativos             | 50 |
| 6.1.1 Título                       | 50 |
| 6.1.2 Institución Ejecutora        | 50 |
| 6.1.3 Beneficiarios                | 50 |
| 6.1.4 Ubicación                    | 50 |
| 6.1.5 Tiempo estimado de ejecución | 50 |
| 6.1.6 Equipo técnico responsable   | 50 |
| 6.2 Antecedentes de la propuesta   | 50 |

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.3 Justificación                                                                | 51 |
| 6.4 Objetivos                                                                    | 51 |
| General                                                                          | 51 |
| Específicos                                                                      | 51 |
| 6.5 Análisis de factibilidad                                                     | 52 |
| 6.6 Fundamentación                                                               | 52 |
| 6.7 Metodología Modelo Operativo                                                 | 52 |
| 6.7.1 Caracterización físico-química de los suelos                               | 52 |
| 6.7.2 Determinación de la población y diversidad bacteriana                      | 53 |
| 6.7.3 Aislamiento, purificación y almacenamiento de los microorganismos aislados | 54 |
| 6.7.4 Caracterización macroscópica de los microorganismos                        | 54 |
| 6.7.5 Caracterización microscópica de los microorganismos                        | 55 |
| 6.7.5.1 Tinción de Gram                                                          | 55 |
| 6.7.5.2 Tinción de Endosporas                                                    | 55 |
| 6.7.5.3 Tinción de Cápsulas                                                      | 56 |
| 6.7.6 Caracterización bioquímica y fisiológica de los aislamientos               | 56 |
| 6.7.6.1 Rango de crecimiento en función de la temperatura                        | 56 |
| 6.7.6.2 Rango de crecimiento en función del pH                                   | 56 |
| 6.7.6.3 Rango de crecimiento en función de la salinidad                          | 56 |

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| 6.7.6.4 Pruebas de crecimiento en función del hidrocarburo | 57 |
| 6.7 Administración                                         | 57 |
| 6.8 Previsión de la evaluación                             | 58 |

### **C. MATERIALES DE REFERENCIA**

|              |    |
|--------------|----|
| Bibliografía | 59 |
| Anexos       | 63 |

### **ÍNDICE DE TABLAS**

|                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Descripción morfológica de colonias bacterianas de acuerdo a la forma, elevación y margen                                                                           | 26 |
| Tabla 2. Clasificación de las bacterias en función de la temperatura de crecimiento                                                                                          | 28 |
| Tabla 3. Clasificación de las bacterias según el rango de crecimiento en función del pH                                                                                      | 29 |
| Tabla 4. Clasificación de las bacterias según el rango de crecimiento en función del pH del medio                                                                            | 29 |
| Tabla 5. Tratamientos en estudio                                                                                                                                             | 31 |
| Tabla 6. Esquema del análisis de varianza                                                                                                                                    | 32 |
| Tabla 7. Codificación de la información para las pruebas de taxonomía numérica para la determinación de la biodiversidad bacteriana en suelos contaminados con hidrocarburos | 33 |
| Tabla 8. Propuesta de la descripción morfológica de colonias bacterianas de acuerdo a la forma, elevación y margen                                                           | 55 |

## ANEXO A. DATOS EXPERIMENTALES

|                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla A1. Características fisicoquímicas de los suelos                                                                                                       | 63 |
| Tabla A2. Número de colonias de bacterias por diluciones y repeticiones para cada uno de los tratamientos en estudio                                         | 63 |
| Tabla A3. Número de colonias diferentes de bacterias                                                                                                         | 64 |
| Tabla A4. Número de ufc/g suelo seco de bacterias                                                                                                            | 64 |
| Tabla A5. Codificación de bacterias aisladas del suelo Arenoso                                                                                               | 65 |
| Tabla A6. Codificación de bacterias aisladas del suelo Arcilloso                                                                                             | 66 |
| Tabla A7. Grupos de color formados por las bacterias aisladas de los suelos contaminados                                                                     | 67 |
| Tabla A8. Descripción morfológica de las colonias bacterianas de acuerdo a la forma, elevación y margen                                                      | 69 |
| Tabla A9. Tinción general de Gram, cápsulas, endosporas y forma de las bacterias aisladas                                                                    | 71 |
| Tabla A10. Número de bacterias que presentaron forma de cocos o bacilos según el tipo de suelo que fueron aisladas                                           | 73 |
| Tabla A11. Número de bacterias que presentaron forma de cocos o bacilos según el medio de cultivo utilizado para su aislamiento                              | 73 |
| Tabla A12. Número de bacterias que presentaron Tinción de Gram positiva o negativa, cápsulas, endosporas según el tipo de suelo que fueron aisladas          | 73 |
| Tabla A13. Número de bacterias que presentaron Tinción de Gram positiva o negativa, cápsulas, endosporas según el tipo medio utilizado para los aislamientos | 74 |
| Tabla A14. Rango de crecimiento de todas las bacterias en función de la temperatura                                                                          | 74 |
| Tabla A15. Clasificación de las bacterias según la Temperatura a partir de los tipos de suelos utilizados para el aislamiento                                | 76 |

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla A16. Clasificación de las bacterias según la Temperatura de acuerdo a los medios de cultivo utilizados para el aislamiento | 76 |
| Tabla A17. Rango de crecimiento de las bacterias aisladas en función del pH                                                      | 77 |
| Tabla A18. Clasificación de las bacterias según el pH a partir de los tipos de suelos utilizados para el aislamiento             | 79 |
| Tabla A19. Clasificación de las bacterias según el pH de acuerdo a los medios de cultivo utilizados para el aislamiento          | 79 |
| Tabla A20. Rango de crecimiento en función de la salinidad (NaCl)                                                                | 79 |
| Tabla A21. Clasificación de las bacterias según la Salinidad a partir de los tipos de suelos utilizados para el aislamiento      | 81 |
| Tabla A22. Clasificación de las bacterias según Salinidad de acuerdo a los medios de cultivo utilizados para el aislamiento      | 82 |
| Tabla A23. Crecimiento en medio enriquecido con petróleo y gasolina                                                              | 82 |
| Tabla A24. Tolerancia de las bacterias a los hidrocarburos a partir de los tipos de suelos utilizados para el aislamiento        | 84 |
| Tabla A25. Tolerancia de las bacterias a los hidrocarburos de acuerdo a los medios de cultivo utilizados del que fueron aisladas | 84 |
| Tabla A26. Taxonomía numérica de datos fenotípicos                                                                               | 85 |
| Tabla A27. Matriz de datos para la elaboración de dendrograma                                                                    | 85 |

## **ANEXO A. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

|                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla B1. Análisis de varianza para el logaritmo del número de unidades formadoras de colonia por gramo seco                                           | 86 |
| Tabla B2. Separación de medias para el número de unidades formadoras de colonia por gramo seco                                                         | 86 |
| Tabla B3. Separación de medias de la interacción tipo de suelo y medios de cultivo de los ufc/g de suelo seco                                          | 87 |
| Tabla B4. Análisis de varianza para la diversidad de colonias                                                                                          | 87 |
| Tabla B5. Separación de medias de la diversidad de colonias                                                                                            | 88 |
| Tabla B6. Separación de medias de la interacción tipo de suelo y medios de cultivo de la diversidad de colonias presentes en los platos de aislamiento | 88 |

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

## **ANEXO C. GRÁFICOS**

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura C1. Bacterias aisladas selectivamente a partir de los suelos contaminados                                             | 89 |
| Figura C2. Bacterias aisladas selectivamente a partir de los suelos contaminados en los diferentes medios utilizados         | 89 |
| Figura C3. Bacterias aisladas selectivamente a partir de Suelo Arenoso con 46.000 TPHs en los diferentes medios utilizados   | 90 |
| Figura C4. Bacterias aisladas selectivamente a partir de Suelo Arcilloso con 31.000 TPHs en los diferentes medios utilizados | 90 |
| Figura C5. Bacterias aisladas clasificadas según su forma                                                                    | 91 |
| Figura C6. Número de bacterias que presentaron Tinción de Gram positiva o negativa                                           | 91 |
| Figura C7. Número de bacterias que presentaron Tinción de cápsulas positiva o negativa                                       | 92 |



|                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura C8. Número de bacterias aisladas de acuerdo al rango de crecimiento en<br>función de la temperatura | 92  |
| Figura C9. Número de bacterias aisladas de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH               | 93  |
| Figura C10. Número de bacterias aisladas de acuerdo al rango de crecimiento en función<br>de la salinidad  | 93  |
| Figura C11. Pruebas de crecimiento en medio enriquecido con petróleo                                       | 94  |
| Figura C12. Pruebas de crecimiento en medio enriquecido con gasolina                                       | 94  |
| Figura C13. Dendrograma para datos fenotípicos                                                             | 95  |
| <b>ANEXO D. MEDIOS DE CULTIVOS Y SOLUCIONES</b>                                                            |     |
| Medios de Cultivo y Soluciones                                                                             | 96  |
| Sistema Búfers                                                                                             | 97  |
| <b>ANEXO E. TABLA DE COLORES</b>                                                                           |     |
| Tabla de colores de Acrilex                                                                                | 99  |
| <b>ANEXO F. FOTOGRAFÍAS</b>                                                                                |     |
| Fotografía 1. Tinción de Gram (bacteria Gram positiva, coco)                                               | 100 |
| Fotografía 2. Tinción de Gram (bacteria gram positiva, bacilo)                                             | 100 |
| Fotografía 3. Tinción de Gram (bacteria gram negativa, coco)                                               | 101 |
| Fotografía 4. Tinción de Gram (bacteria gram negativa, bacilo)                                             | 101 |
| Fotografía 5. Tinción de cápsulas                                                                          | 102 |
| Fotografía 6. Tinción de endosporas                                                                        | 102 |
| Fotografía 7. Crecimiento de bacterias a temperatura de 4°C                                                | 103 |

|                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------|-----|
| Fotografía 8. Crecimiento de bacterias a temperatura de 28°C              | 103 |
| Fotografía 9. Crecimiento de bacterias a temperatura de 37°C              | 104 |
| Fotografía 10. Crecimiento de bacterias a temperatura de 50°C             | 104 |
| Fotografía 11. Crecimiento de bacterias a pH 4.5                          | 105 |
| Fotografía 12. Crecimiento de bacterias a pH 5.5                          | 105 |
| Fotografía 13. Crecimiento de bacterias a pH 6.5                          | 106 |
| Fotografía 14. Crecimiento de bacterias a pH 7.5                          | 106 |
| Fotografía 15. Crecimiento de bacterias en 1% de Cloruro de sodio         | 107 |
| Fotografía 16. Crecimiento de bacterias en 5% de Cloruro de sodio         | 107 |
| Fotografía 17. Crecimiento de bacterias en 10% de Cloruro de sodio        | 108 |
| Fotografía 18. Crecimiento de bacterias en medio enriquecido con petróleo | 108 |
| Fotografía 19. Crecimiento de bacterias en medio enriquecido con gasolina | 109 |

## RESUMEN

La recuperación de ambientes contaminados con hidrocarburos utilizando la técnica de biorremediación exige un adecuado estudio, aislamiento y caracterización de los microorganismos presentes en los suelos contaminados. Debido a que muchas veces los microorganismos que están presentes en dichos suelos, tienen la capacidad de sobrevivir a esos ambientes de contaminación y algunos hasta de utilizar a los hidrocarburos como fuente de energía.

En el presente estudio se determinó tanto la población como la diversidad de bacterias presentes en suelos contaminados con derivados de petróleo (TPHs). De ésta manera, del suelo arenoso (46.000 TPHs) con un pH de 6.4, se aisló el mayor número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco ( $1.05 \times 10^{11}$ ), mientras que en el suelo arcilloso (31.000 TPHs) con un pH de 5, fue el más bajo con  $8 \times 10^6$  ufc/ por gramo de suelo seco. Al comparar los resultados, la población del suelo arenoso es 10000 veces mayor que la del arcilloso. Además se logró aislar en cultivo puro setenta y tres bacterias, que en su mayoría posiblemente pueden ser catalogadas como biodegradadoras de hidrocarburos, puesto que se desarrollaron en medios con petróleo y gasolina como única fuente de carbono. La mayoría de bacterias fueron mesófilas y neutrotolerantes, indica que estos microorganismos poseen un rango normal o neutro de crecimiento en relación a la temperatura, y pH. Finalmente, basado en un análisis taxonomía numérica de datos fenotípicos, y el dendrograma, al 90% de similaridad, dividió a las setenta y tres bacterias aisladas originalmente, en 8 grupos-especie.

Los datos obtenidos en la presente investigación demuestran la gran biodiversidad bacteriana en suelos contaminados con hidrocarburos, en este caso provenientes del campo Sacha-Provincia de Orellana en la región amazónica. También abre rutas de investigación que podrían permitir el descubrimiento de bacterias útiles para la recuperación de suelos contaminados, mediante técnicas de biorremediación ambiental.

## SUMMARY

The recovery of hydrocarbon-contaminated environments using bioremediation technique requires an appropriate study, isolation and characterization of microorganisms in contaminated soils. Because many times the microorganisms that are present in the same soils, have the capacity to survive in these environments from contamination and use hydrocarbons as a source of energy.

In the present study was determined the population and the bacteria's diversity in soils contaminated with petroleum (TPH). In this way, sandy soil (46.000 TPH) had more isolated than clayey soil. First one with  $1.05 \times 10^{11}$  colony forming unites (ufc/g) per gram soil dry, while in the clayey soil (31.000 TPH) with  $8 \times 10^6$  ufc/g soil dry. This means that when comparing the results, that sandy soil populations is 10.000 more than clayey soil. Furthermore was isolated in pure culture seventy-three bacterias, most of which can possibly be categorized as bio-digesting hydrocarbons, because these were developed petroleum and gasoline as unique carbon source. Most of there were mesophilic and neutrotolerantes bacterias, indicating that these microorganisms have a range of normal or neutral in relation to growth temperature, and pH. Finally, based on a numerical taxonomy analysis of phenotypic data, and after performing the dendrogram 90% similarity divided seventy-three the bacteria originally isolated in pure culture in 8 species groups.

The data obtained in this investigation demonstrate the enormous bacterial biodiversity in soils contaminated with hydrocarbons, in this case from Campo Sacha - Orellana Province in the Amazon region. It also this research could enable the discovery of bacteria useful for contaminated soil remediation, through environmental bioremediation techniques.

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

### 1.1 Tema de Investigación

Determinación de la Biodiversidad Bacteriana Presente en Suelos Contaminados con Hidrocarburos para uso Potencial en Biorremediación.

### 1.2 Planteamiento del problema

#### 1.2.1 Contextualización

##### **Macro**

El petróleo es imprescindible, necesario y decisivo para el desarrollo a nivel mundial. En la actualidad la sociedad vive rodeada de petróleo o sus derivados, como son la gasolina, plásticos, tuberías, en algunas aplicaciones farmacéuticas y en el queroseno de los aviones. El petróleo es considerado como la mayor fuente de energía en el mundo. El 50% de esta demanda corresponde al gasóleo y a la gasolina para los 500 millones de vehículos, aeronaves y buques. Mientras que el otro 50% representa al fuelóleo, para la industria petroquímica y gas licuado de petróleo (GLP). A este ritmo de consumo se estima que habrá petróleo para unos 50 años. Alrededor del mundo aproximadamente 65 millones de barriles de petróleo son utilizados, existiendo también una pérdida de 2'381.000 barriles anuales por derrames desde la explotación hasta el refinado del crudo (Bustelo, 1994; Rosell, 2007).

##### **Meso**

Para la explotación petrolera en el oriente ecuatoriano, se ha tenido que construir carreteras, permitiendo así la colonización de nuevos lugares. Esto ha llevado a la deforestación de un millón de hectáreas de bosques. Por otro lado, el proceso propio de explotación genera más de 4.3 millones diarios de desechos tóxicos, que en su mayoría son eliminados al ambiente sin darle ninguna clase de tratamiento. Además los residuos de petróleo que son regados en las carreteras para evitar el levantamiento de polvo, son esparcidos por la lluvia hacia el medio ambiente. Lamentablemente, las

compañías se liberan de cualquier responsabilidad, argumentando que el petróleo es la fuente para el desarrollo del país (Instituto de Epidemiología y Salud Comunitaria "Manuel Amunárriz, 2000; Barnes, 2008).

Uno de los eventos de contaminación ambiental más relevantes sucedió en las Islas Galápagos en el 2001 cuando el Buque-tanque Jessica derramó 900.000 litros de bunker y diesel, destruyendo fauna y flora a su paso. Así también, en febrero del 2011, el derrame de 6359 litros de hidrocarburos en Esmeraldas ocurrió debido a negligencias de PETROECUADOR. Por otra parte existen poblaciones que están constantemente afectadas por la explotación y transporte de hidrocarburos que son las de Lago Agrio y Shushufindi, debido a la contaminación generada en el proceso, provocando el deterioro de las cosechas, muerte de los animales, aparición de enfermedades y la carencia de algunos recursos básicos como agua y suelo (Varea & Ortiz, 1995; Ministerio del ambiente, 2011).

## **Micro**

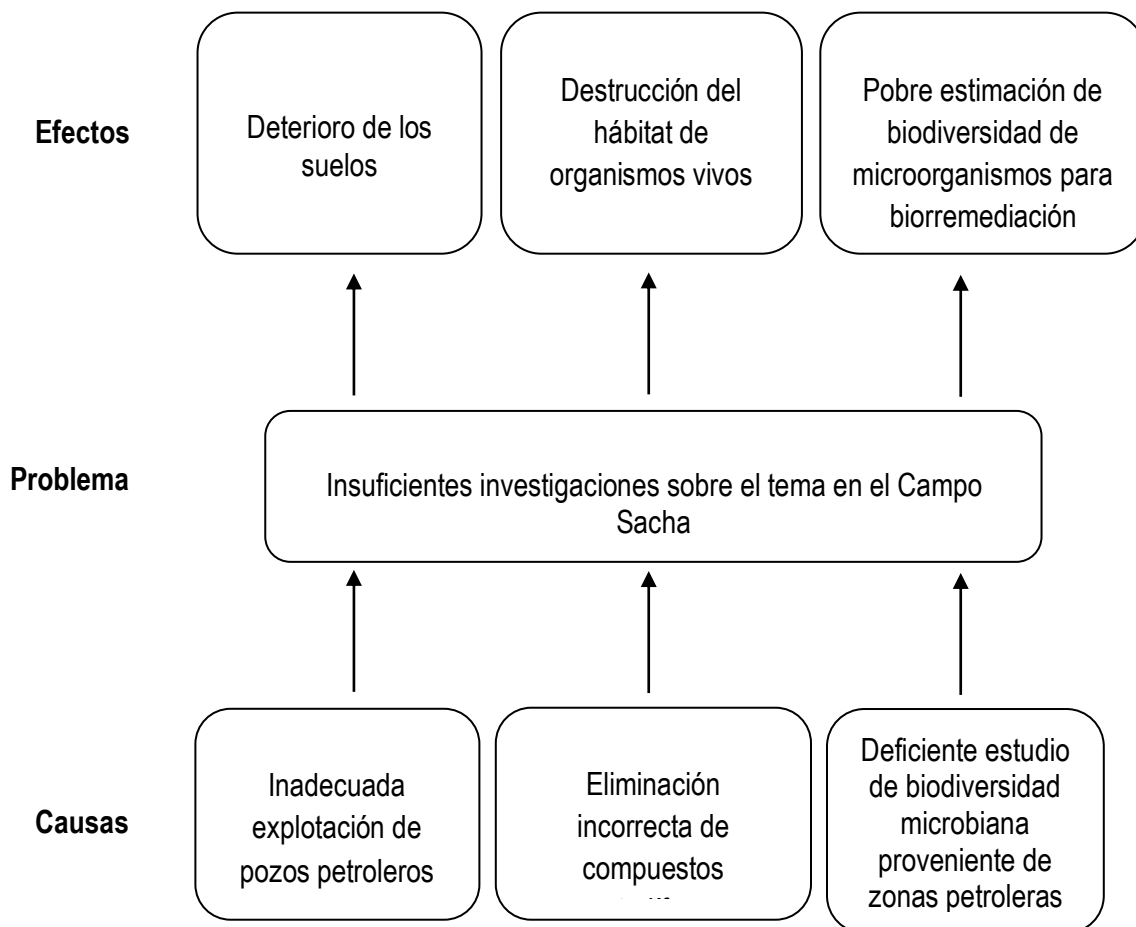
El suelo es considerado como un filtro natural para muchos residuos. También posee características biodegradadoras que ayudan a la descomposición natural de los contaminantes. Por ello, varios grupos de microorganismos que se encuentran en el suelo pueden ser usados para biorremediación. Esta técnica permite eliminar o reducir riesgos medioambientales, mediante la degradación de contaminantes por la acción de organismos vivos. Es muy usada en la actualidad debido a su bajo costo, los productos finales son inocuos, y se ha demostrado que existe una mayor eficacia en comparación con las técnicas físico-químicas. Es posible realizarlo tanto *in situ* como *ex situ* (Blasco *et al.*, 2005; Manahan, 2007).

Los microorganismos que degradan petróleo son muy diversos, entre ellos se encuentran las bacterias *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas oleovorans*, hongos como *Aspergillus*, *Acremonium*, *Botrytis*, *Geotrichum*, *Penicillium* y *Fusarium*. Estos organismos vivos están presentes en el suelo y en ocasiones están en número suficiente para su proliferación. La estimulación del crecimiento de estos microorganismos nativos se realiza mediante la adición de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo, además de un aceptor de electrones que actúa como oxidante. En el tratamiento de hidrocarburos el mismo suelo proporcionara tanto el oxígeno como los nutrientes para el desarrollo

del microorganismo. Normalmente los residuos que son propensos a los tratamientos biológicos son biodegradables, aunque en ocasiones en suelos contaminados con desechos peligrosos tienden a formarse cultivos bacterianos que podrían ser útiles para la degradación después de una larga aclimatación (Blasco *et al.*, 2005; Manahan, 2007). Si bien es cierto que éste tipo de procesos se pueden implementar, es posible también aislar los microorganismos en condiciones *in vitro*, para así determinar su diversidad y abundancia. Además, se facilita la determinación de la eficiencia de transformación de petróleo y sus derivados, en compuestos menos tóxicos. Esto puede servir de base para la fabricación de un producto con bacterias eficientes para la biorremediación. (Bedoya, 2003).

## 1.2.2 Análisis crítico

### 1.2.2.1 Diagrama causa-efecto



### **1.2.3 Prognosis**

El no aislamiento y caracterización de bacterias con uso potencial en biorremediación impediría la reducción de contaminantes hidrocarburíferos en zonas afectadas, al igual que permitiría un aumento de la contaminación ambiental por parte del petróleo y sus derivados. La finalidad de establecer una propuesta para combatir la contaminación causada por hidrocarburos será brindar una alternativa de descontaminación biológica, que ayudaría tanto ambientalmente como a nivel de mejoras en la salud de las personas expuestas a este tipo de desechos.

### **1.2.4 Formulación del problema**

El problema planteado hace referencia a la contaminación del suelo con hidrocarburos. Por tanto, el problema formulado es:

¿De qué manera se lograría aislar y caracterizar preliminarmente a bacterias con uso potencial para biorremediación de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con hidrocarburos?

### **1.2.5 Preguntas directrices**

- ¿De qué manera se lograría aislar selectivamente bacterias con potencial para la biorremediación?
- ¿Cómo se establecería el medio de cultivo óptimo para aislamiento de bacterias biodegradadoras de hidrocarburos?
- ¿Por qué se debería caracterizar macroscópica y microscópicamente las bacterias aisladas?
- ¿Se podría determinar la diversidad biológica de las bacterias obtenidas?

### **1.2.6 Delimitación de la investigación**

Campo: Investigación

Área: Microbiología

Sub-área: Biotecnología Microbiana



|             |   |                                                                        |
|-------------|---|------------------------------------------------------------------------|
| Sector      | : | Biorremediación                                                        |
| Sub-sector: |   | Diversidad microbiana                                                  |
| Geográfica: |   | Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica de Ambato (UTA) |
| Temporal:   |   | Noviembre 2011- Octubre 2012                                           |

### **1.3 Justificación**

En un estudio realizado por Ochoa y Velarde (2009), se encontraron 143 pasivos ambientales dentro del campo Auca, provincia de Orellana. Se cree que el número total puede acercarse a los 5000 tomando en cuenta todas las regiones en donde existe explotación petrolera. Lo que ha provocado un alto grado de contaminación, tanto en las zonas de explotación, como en el lugar donde se desarrolla la refinación y transporte del petróleo. La formación de los pasivos ambientales en zonas de la Amazonía es preocupante debido a que en ocasiones los daños provocados en la salud son irremediables, provocando además la extinción de especies endémicas que ahí habitan.

El presente estudio pretende determinar la población y abundancia de bacterias presentes en sitios contaminados con hidrocarburos o sus derivados. Los resultados obtenidos servirán para aislar y caracterizar bacterias a las que posteriormente se podrá determinar la capacidad biodegradadora de hidrocarburos. Se contribuirá también para establecer un banco de germoplasma bacteriano con fines de biorremediación. El beneficio a obtenerse será tanto ambiental y económico, como para la que la Universidad Técnica de Ambato, y la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, se conviertan en pioneras en la comercialización de bacterias degradadoras de hidrocarburos.

### **1.4 Objetivos**

#### **1.4.1 General**

- Determinar la biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para uso potencial en biorremediación.

#### **1.4.2 Específicos**

- Determinar la población de bacterias presentes en suelos contaminados con derivados de petróleo.
- Aislar selectivamente bacterias procedentes de suelos contaminados con potencial para la biorremediación.
- Caracterizar fenotípicamente las bacterias aisladas.
- Determinar la diversidad biológica de las bacterias obtenidas.

## CAPITULO II

### MARCO TEORICO

#### 2.1 Antecedentes Investigativos

##### 2.1.1 Actividad petrolera en Ecuador

El petróleo desde su descubrimiento, ha sido de gran importancia en el desarrollo de los países, principalmente en su uso para el transporte y la petroquímica. Las primeras exploraciones de este hidrocarburo se dieron en la época moderna, en lo que hoy se conoce como península de Santa Elena, por compañías como Carolina Oil Co., Anglo Ecuatorian y Cautivo Petrolera Ecuatoriana, en propiedades a nombre del señor Mier. La producción al inicio era de 5000 barriles, pero luego descendió a 400 barriles de crudo por lo que no era rentable. Debido a esto, se tenía que importar otros combustibles como gasolina y diesel para satisfacer las necesidades del mercado. Posteriormente la exploración se realizó en el oriente ecuatoriano por parte de las empresas Leonard Exploration y Royal Dutch Shell, quienes no habían encontrado petróleo, originándose la frase “el oriente es un mito”, pronunciada por el presidente de esa época Galo Plaza. En 1964 las empresas Texaco y Gulf realizan otra exploración de un millón y medio de hectáreas con la autorización de explotar los recursos a obtenerse en un tiempo de 40 años. En 1967 el consorcio Texaco-Gulf encuentra grandes reservas del hidrocarburo en un pozo denominado Lago Agrio 1, el cual hizo brotar 2600 barriles de petróleo diarios (Fontaine, 2004; Figueroa, 2006).

La nueva historia petrolera en el Ecuador inicia en 1972 con la creación de CEPE (Corporación Estatal Petrolera), este organismo tomo decisiones como la construcción de la Refinería Estatal Esmeraldas y llegó a ser el socio mayoritario del consorcio Texaco-Gulf. Finalmente en 1989 el control total de la explotación petrolera queda a cargo de Petroamazonas, ahora conocida como Petroecuador. En febrero de 1990 se forma la Unidad de Protección Ambiental que pretendía la preservación y acción ecológica en las áreas de operación petrolera, con un rol importante de prevenir y controlar la contaminación ambiental. A más de la ley, Petroecuador contaba con un documento llamado Plan Integral de Manejo Ambiental de la Actividad Hidrocarburífera, el cual trataba de los aspectos físico, biológicos, ecológicos y socioeconómicos, e impactos ambientales. Además incluía la formulación de planes específicos y recomendaciones para todas las fases de la

industria del petróleo. Sin embargo, ni este documento ayudó a detener la mala práctica petrolera por parte de la empresa Chevron Texaco, ahora en juicio contra el Estado Ecuatoriano, que insiste en la remediación y prevención de daños futuros al ambiente y a la salud, más que en el pago de indemnizaciones por daños pasados (Fontaine, 2004; Ortiz & Varea, 1995).

El país tiene una producción de aproximadamente 300.000 barriles por día y un volumen de reservas petroleras de mil millones de barriles. De todos estos ingresos solo una pequeña parte es destinada a la Amazonía, lo que impide su desarrollo. En el Ecuador 360 hectáreas están relacionadas a la producción, mientras que 3 millones de hectáreas están en fase de exploración, junto a 7 nuevos bloques ofertados por Petroecuador. Esto representa que 5 millones de bosques Amazónicos serán destinados a dichas operaciones. Napo y Sucumbíos desempeñan el mayor papel en esta actividad, ya que seis empresas extranjeras operan en esas provincias (Ortiz & Varea, 1995).

### **2.1.2 Composición del petróleo**

La composición del petróleo no varía mucho de acuerdo a su composición elemental, ligeras variaciones afectarían la comercialización del producto final, debido a que influyen en las propiedades físicas de los derivados. El petróleo es un fluido natural compuesto por una mezcla compleja de hidrocarburos aromáticos, naftalénicos y parafínicos, pero también elementos no hidrocarbonados en forma de moléculas complejas en cantidades minoritarias. La composición elemental aproximada del crudo es: 80-88% de carbono, 10-15% de hidrogeno, 0-3% de nitrógeno, 0.2-5% de azufre y 0-1% de oxígeno, la cual varía de acuerdo al yacimiento (Gary & Handwerk, 1980; Seoáñez, 2002; Blasco *et al.*, 2005).

Por otra parte, el comportamiento del petróleo en el suelo depende de sus propiedades fisicoquímicas como el punto de ebullición, al igual que de las características del suelo como tamaño de grano, porosidad, tipo de suelo, permeabilidad, contenido de material orgánico y sobretodo la capacidad de intercambio iónico. Además otro parámetro importante a tomar en cuenta es el contenido total de hidrocarburos de petróleo (TPH), puesto que es útil para la determinación de la biodegradabilidad. A mayores valores de TPHs mejor es la calidad de petróleo, pero valores elevados en el suelo significan altos niveles de contaminación (Amusquivar, 2002; Blasco *et al.*, 2005).

Blasco *et al.* (2005) mencionan la siguiente clasificación química de los hidrocarburos petrolíferos:

- i) Alifáticos: son compuestos de estructuras lineales, ramificadas o cíclicas con varios tipos de enlaces, como alcanos, cicloalcanos, alquenos y alquinos.
- ii) Aromáticos: son compuestos cíclicos con dobles enlaces conjugados, como los monocíclicos de un solo anillo que pueden o no estar sustituidos con cadenas laterales, y los policíclicos o naftenoaromáticos con dos o más anillos aromáticos condensados.

### **2.1.3 Metabolismo de la degradación biológica de hidrocarburos**

Los hidrocarburos alifáticos lineales como alcanos, alquenos y los hidrocarburos ramificados, son un importante sustrato para varios grupos de microorganismos. Estos utilizan mecanismos bioquímicos para la degradación, lo que depende de las propiedades del hidrocarburo. La oxidación del metano por parte de bacterias aerobias, es un caso especial de oxidación de alcanos, mediante un sistema de enzimas especializadas que incluye a la metano-monooxigenasa. Cadenas largas de alcanos y alquenos son degradados por la conversión de estos en cadenas largas de ácidos grasos y posteriormente usando la vía metabólica de beta-oxidación (Chapelle, 2001).

Las cadenas de n-alcanos que tienen más de 10 carbonos, son asimiladas dentro de las células y oxidadas más rápidamente que las cadenas cortas de n-alcanos. Esto se debe a que los hidrocarburos que tiene de 2-10 carbonos son más solubles en agua que en otros compuestos, esta solubilidad confiere toxicidad, por lo que a las células se les dificulta la regulación del transporte de los ácidos grasos a través de la membrana. Una importante excepción para esta regla es la oxidación del metano, la cual es común en superficies de agua, sedimentos acuáticos, suelos y ambientes subterráneos. Los géneros de bacteria que realizan esta oxidación son *Methylobacter*, *Methylocystis* y *Methylobacterium* (Chapelle, 2001).

Los hidrocarburos alicíclicos como ciclopentano, ciclohexano y otros pueden ser utilizados como fuente de carbono en el crecimiento microbiano. La oxidación de hidrocarburos alicíclicos se debe realizar con una previa aclimatación de los microorganismos en varios hidrocarburos alifáticos. Un ejemplo es la oxidación del ciclohexano, el cual es transformado a ciclohexanol, para luego realizar

una deshidrogenación para formar una cetona alicíclica. Luego la 1,2 monooxigenasa cataliza la inserción de un oxígeno en el anillo, se rompe el anillo con una hidrolasa y finalmente una reacción de deshidrogenación produce la formación de un ácido dicarboxílico que puede ser degradado por la beta-oxidación. Por otra parte, para la degradación de compuestos aromáticos como tolueno, benceno y xileno se utilizan igualmente microorganismos ya que la triple estructura C=C que estos poseen es muy estable y puede ser usada por bacterias como *Pseudomonas* como fuente de energía (Chapelle, 2001).

### **2.1.3.1 Bases Bioquímicas**

La composición del petróleo es una excelente fuente de energía para los microorganismos al igual que lo es para la industria. La degradación de hidrocarburos la realizan mayoritariamente las bacterias y en condiciones aeróbicas. Aunque también se da en ausencia de oxígeno, siendo impedimento la necesidad de aceptores como sulfato, nitrato y hierro (III).

Químicamente los hidrocarburos son muy inertes por lo que es necesaria su activación para su posterior degradación. En los Hidrocarburos alifáticos la ruta se da por la oxidación grupo metilo hasta carboxilo, convirtiéndose de un compuesto hidrofóbico a un ácido graso, asimilable por la beta oxidación. Los microorganismos que pueden realizar este proceso son *Nocardia*, *Pseudomonas* y *Mycobacterium*. La enzima que cataliza este proceso se llama alcano oxidasa. Mientras que en los hidrocarburos aromáticos la ruta metabólica se da con intermediarios como el catecol y un ataque posterior de enzimas dioxigenasas, generando así succinato, acetil-CoA y piruvato que son intermediarios del ciclo de Krebs (Blasco *et al.*, 2005).

La mayoría de bacterias degradadoras de hidrocarburos, asimilan alcanos, debido a que estos son los componentes más abundantes del crudo de petróleo. No obstante se conocen cepas con capacidad de oxidar selectivamente las cadenas alquílicas, siendo esta una propiedad específica del género de bacteria con el cual se trabaje (Blasco *et al.*, 2005; Juárez 2002).

### **2.1.3.2 Bases Genéticas**

Algunos genes responsables de la degradación de varios componentes del petróleo, se encuentran en los plásmidos. En 1972 y 1973 se descubrieron los primeros plásmidos catabólicos relacionados con la degradación de hidrocarburos (SAL y OCT) por el Doctor Chakrabarty y sus colaboradores. Además, la primera patente de un ser vivo fue asignada a General Electric. La patente se trataba de la construcción de una bacteria del género *Pseudomonas*, en la que se introdujeron cuatro plásmidos, de los cuales dos se mantienen estables y codifican la degradación de hidrocarburos. Los plásmidos y la bacteria eran naturales, pero lo que ocurría no era accidentalmente por lo que se procedió a patentar (Blasco *et al.*, 2005).

### **2.1.4 Diversidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos**

Las bacterias degradadoras de hidrocarburos tienen la capacidad de utilizar el petróleo como fuente de energía, transformándolo en compuestos menos nocivos para el medio ambiente. La mayor parte de estudios acerca de éste grupo de bacterias se han llevado a cabo con cepas bacterianas individuales o en la combinación de diferentes cepas aisladas, con capacidad para retener metales pesados en su pared celular y eliminar azufre procedente de hidrocarburos. Entre los géneros utilizados como degradadores de petróleo se encuentran *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Sarcina*, *Serratia*, *Spirillum*, *Streptomyces*, y *Vibrio*. (Souza, 2007).

Las ventajas del uso de estos microorganismos es que alteran la estructura química de compuestos nocivos, convirtiéndolos en inocuos y en algunos casos beneficiosos. Además pueden extraer contaminantes mezclados en el agua y suelo. En algunas ocasiones existen consorcios bacterianos para la degradación, que pueden ser consorcios definidos y consorcios no definidos. Los consorcios definidos son una combinación de cepas aisladas con capacidades biodegradativas complementarias entre sí. Los consorcios no definidos son el resultado de procesos de enriquecimiento a partir de muestras ambientales con historia previa de contaminación y por lo tanto no son el resultado de una combinación de cepas previamente aisladas (Case *et al.*, 2007; Manahan, 2007; Souza, 2007).

### 2.1.5 Aislamiento selectivo de bacterias presentes en suelos contaminados con TPHs

El aislamiento selectivo se lo realiza cuando se necesita aislar a un cierto tipo de bacterias de una mezcla de varios microorganismos. Esto se obtiene agregando al medio inhibidores tales como antibióticos, sales o antisépticos, al igual que sustancias asimilables únicamente por el microorganismo que se requiere aislar. En ocasiones no se está totalmente seguro del microorganismo obtenido, por lo que se debe realizar pruebas bioquímicas y genéticas para su identificación (Montville & Matthews, 2008). En los medios selectivos siempre se desarrollan ciertas bacterias diferentes a las requeridas, por lo que para diferenciar las colonias formadas, se adiciona a los medios selectivos algunas sustancias que reaccionan con la actividad metabólica de las bacterias, presentando distintas coloraciones, esto se lo conoce como aislamiento selectivo diferencial (Prats, 2006).

La recuperación de los ambientes contaminados con hidrocarburos requiere de una apropiada caracterización, estudio y aislamiento de los microorganismos presentes en el lugar de contaminación. El petróleo al ser rico en materia orgánica, puede ser degradado de manera natural en condiciones aeróbicas. Como por ejemplo la bacteria *Pseudomonas putida* fue utilizada para remediar la contaminación producida por Exxon Valdez en las costas de Alaska. (Belloso & Carrario, 2000; Blasco *et al.*, 2005).

Durante años se ha conseguido aislar bacterias degradadoras de hidrocarburos de suelos contaminados, para luego cultivarlas en el laboratorio y alimentadas con hidrocarburo puro como única fuente de carbono. Estas bacterias podrían acelerar los procesos de biorremediación en el suelo, luego de proporcionar los nutrientes y condiciones adecuadas para su desarrollo. Algunas bacterias conocidas pertenecen al género *Dietzia*, aisladas de zonas de derrames de petróleo, degradan aceites y crudo. *Gordonia alkanivorans*, *Mycobacterium gilvum*, *Rhodococcus erythropolis*, y *Marinobacter*, han sido aisladas de agua de mar, y degradan pirenos, hidrocarburos aromáticos, n-alcanos, alquilbenzenos y crudo, respectivamente. *Pseudomonas putida* ha sido aislada a partir de sedimentos marinos, y tiene la capacidad de degradar alquilbenzenos (Belloso & Carrario, 2000; Figueroa, 2005).

Muchos son los métodos para la enumeración de degradadores de hidrocarburos. Entre ellos se encuentra el número más probable (NMP). Esta es una técnica estadística que se basa en una



teoría de probabilidad. Una suspensión de células en buffer es diluida, luego esto se inocula en múltiples tubos que contienen medio de cultivo e hidrocarburo estéril. Este debe ser el mismo del lugar de contaminación. Para determinar el final de NMP se debe tener en cuenta la turbiedad de los tubos y la ruptura del hidrocarburo (Barnes *et al.*, 2008).

Por otra parte, la ingeniería genética ha aportado grandes desarrollos mediante el aislamiento, manipulación y expresión genética, puesto que se ha logrado obtener degradadores de petróleo mediante técnicas como PCR o modificación de los genes y plásmidos de bacterias, para obtener organismos capaces de degradar o de acelerar la velocidad de degradación de hidrocarburos en ambientes contaminados (Liscano, 2005).

El aislamiento selectivo de bacterias con potencial para biorremediación ha sido realizado de tal manera que se pueda determinar una capacidad inicial para usar TPHs como fuente de nutrientes. En un experimento realizado con suelos contaminados con TPHs, recolectados cerca de la ciudad de México, se aislaron varios tipos de microorganismos capaces de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono. La composición del medio de aislamiento fue  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5.7g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.3g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.2g, con y sin levadura, suplementados con aceite de motor y diesel, tanto en caldo, como en medio sólido. Luego del período de incubación se determinó que existió un mayor crecimiento en los medios en los que se encontraban presentes los hidrocarburos (Castro *et al.*, 2003).

En Perú se aislaron selectivamente bacterias procedentes de suelos contaminados con hidrocarburos en la Refinería San Lorenzo, industria petrolera ubicada en la Ciudad de San Lorenzo, Provincia de Santa Fé. Diluciones del suelo al 1% fueron sembradas en tubos con 5 ml de caldo Bushnell – Haas (Sulfato de magnesio 0.200 g; Cloruro de calcio 0.020 g; Fosfato monopotásico 1.000 g; fosfato dipotásico 1.000 g; nitrato de amonio 1.000 g; cloruro férrico 0.050 g; Agar 20.000 g; agua destilada 1000 ml, pH final de  $7.0 \pm 0.2$  y temperatura de  $25^\circ \text{C}$ ), junto con 50  $\mu\text{l}$  de n-hexadecano esterilizado por radiación UV y 100  $\mu\text{l}$  de una solución estéril de resazurina. Usando el Kit API 20E se pudo identificar solo una de las siete cepas aisladas, la cual correspondió a *Pseudomonas aeruginosa* (Bushnell & Haas, 1941; Belloso & Carario, 2000). Otros medios de cultivo utilizados han sido suplementados directamente con petróleo como única fuente de carbono y energía, aislando cepas correspondientes a *Pseudomonas aeruginosa*. Una de las cepas obtenidas presentó un 57% de biodegradación de petróleo (Abalos *et al.*, 2008).

Además una colección de 38 bacterias fueron obtenidas con cultivo enriquecido a partir de suelos contaminados con hidrocarburos en Daqing, China, de las cuales 22 cepas utilizaron diesel como única fuente de carbono y energía. La colección de bacterias aisladas podrían ser utilizadas como recurso para biorremediación en suelos contaminados y bio-tratamiento de derrames de petróleo en aguas.

### **2.1.6 Aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos**

Durante años se ha conseguido aislar bacterias degradadoras de hidrocarburos de suelos contaminados, para luego cultivarlas en el laboratorio y alimentadas con hidrocarburo puro como única fuente de carbono. Estas bacterias podrían acelerar los procesos de biorremediación en el suelo, luego de proporcionar los nutrientes y condiciones adecuadas para su desarrollo. Algunas bacterias conocidas son, *Dietzia sp.*, aislada de zonas de derrames de petróleo y degrada aceites y crudo. *Gordinia alkanivorans*, *Mycobacterium gilvum*, *Rhodococcus erythropolis*, *Marinobacter sp.*, todas aisladas de agua de mar y degradan pirenos hidrocarburos aromáticos, n-alcanos, alquilbenzenos, crudo, respectivamente y *Pseudomonas putida* aislada desde sedimentos marinos que tiene la capacidad de degradar alquilbenzenos (Belloso & Carrario, 2000; Figueroa, 2005).

### **2.1.7 Biorremediación**

Desde sus inicios la biorremediación ha aportado con grandes beneficios para la humanidad y sobre todo para el medio ambiente. En 1989 el buque petrolero Exxon Valdez, derramó su contenido de petróleo sobre las costas de Alaska y mediante adición de nitrógeno se estimuló el desarrollo de microorganismos capaces de degradar el crudo disminuyendo así su toxicidad (Baird, 2001; Case *et al.*, 2007).

La biorremediación es una técnica que se emplea para aumentar los procesos aeróbicos de degradación que se dan de manera natural en el suelo. Se pueden emplear organismos vivos como plantas, hongos y bacterias. Si estos organismos son propios de la zona se los conoce como autóctonos, mientras que si pertenecen a otros sitios se los conoce como exógenos. Si la biorremediación se realiza en el lugar de la contaminación se la conoce como *in situ*, mientras que si el tratamiento de los contaminantes se da en biorreactores o fuera del lugar de la contaminación se la llama *ex situ* (Velasco & Volke, 2004; Blasco *et al.*, 2005; Domènech, 2006).

El bioaumentación o biomagnificación es la adición de microorganismos naturales o genéticamente modificados, mientras que la bioestimulación es la modificación del medio para mejorar el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, para ello se debe también añadir nutrientes como oxígeno y nutrientes, siendo estos, dos tipos de biorremediación *in situ*. (Blasco *et al.*, 2005).

Por otra parte la biorremediación *ex situ* puede ser en fase sólida y en fase de lodos. La primera también conocida como composteo es un proceso biológico en el cual la materia contaminada se mezcla con paja, aserrín, estiércol o desechos agrícolas para así mejorar el balance de los nutrientes, mejorar la aireación y aumentar el calor. Este proceso se puede realizar en tambores rotatorios, biopilas y recipientes abiertos. Y la segunda, en fase de lodos o biorreactores es un proceso que se utiliza cuando se debe reducir el tiempo de tratamiento y el material contaminado produce emisiones peligrosas. Los biorreactores de lodo son los más utilizados debido a que se pueden combinar procesos químicos, físicos y biológicos (Velasco & Volke, 2004).

Para que el proceso de biorremediación se realice de la mejor manera se deben cumplir ciertas condiciones según Baird (2001), la primera que el residuo debe ser degradable biológicamente y su estructura física apropiada para los microorganismos, la segunda es que los microorganismos deben ser apropiados, diversos y estar en cantidades suficientes, y finalmente condiciones apropiadas de pH, temperatura y nivel de oxígeno, si lo requieren.

En la actualidad el Gobierno ecuatoriano mediante el Ministerio del Ambiente ha elaborado un Plan de Reparación Ambiental y Social denominado PRAS, el cual con alianza con Universidades y Escuelas Superiores Politécnicas del país, viene desarrollando estrategias de reparación de pasivos ambientales mediante el uso de biorremediación. Los planes y estrategias se cuentan ya para los derrames en la línea de flujo del pozo Shushufindi 13, Sacha 161 y de las piscinas y derrame en la línea de flujo del pozo Atacapi 2 (Ministerio del Ambiente, 2011).

### **2.1.8 Taxonomía numérica**

La taxonomía es la ciencia que establece y diferencia a las especies unas de otras, además las agrupa y ordena en unidades jerarquizadas. Esta ciencia se fundamenta en los datos descriptivos y aplica un sistema de nombres científicos para nombrar a las jerarquías establecidas. Atiende a dos aspectos fundamentales, el primero es identificar y describir de la manera más completa las

unidades taxonómicas básicas (las especies) y el segundo es desarrollar un sistema para ordenar y catalogar dichas unidades. Cuando se estudian muchas cepas microbianas de un grupo determinado pueden distribuirse en una serie de agrupamientos discontinuos o *clusters*, estos agrupamientos de cepas se definen como especies (Moreno & Borgues, 2004).

Michel Adanson fue el primero en sugerir un planteamiento alternativo de tipo empírico que se basa en la cuantificación de las semejanzas y diferencias entre los organismos usando un amplio número de cepas (unidades taxonómicas operacionales=UTO<sub>s</sub>) y contrastando un gran número de propiedades fenotípicas, normalmente entre 50 y 200, las que incluyen características morfológicas, sensibilidad a antibióticos y compuestos orgánicos, entre muchas otras. Esto se conoce como taxonomía adansoniana, computarizada, fenética o clasificación numérica. Se asume que si a cada carácter fenotípico se le da un valor explícito, debe ser posible expresar numéricamente las distancias taxonómicas entre organismos, en función al número de caracteres que comparten dentro del total de caracteres estudiados. Los resultados de cada cepa son ingresados en una computadora para determinar las semejanzas y diferencias entre microorganismos y establecer así los grados de relación entre los distintos grupos. Estos grados de relación están determinados por el número de similitudes entre las propiedades de los microorganismos. Se calcula el coeficiente de semejanza y coincidencia, así como el porcentaje de semejanza (Pumarola, 1995).

Para la determinación de los coeficientes de semejanza y de coincidencia de dos cepas bacterianas, caracterizadas con respecto a un número elevado de caracteres diferentes se utilizan dos ecuaciones:

Coeficiente de semejanza

$$S_j = \frac{a}{a + b + c}$$

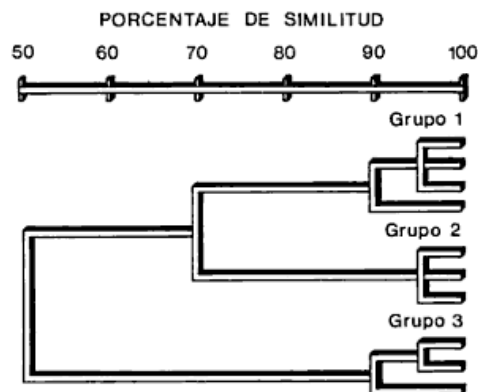
Coeficiente de simple coincidencia

$$S_{sm} = \frac{a + b}{a + b + c + d}$$

Donde:

- a: Número de caracteres positivos en ambas cepas
- b: Número de caracteres positivos en la cepa 1 y negativos en la cepa 2
- c: Número de caracteres negativos en la cepa 1 y positivos en la cepa 2
- d: Número de caracteres negativos en ambas cepas

Los porcentajes de similitud se tabulan para conocer la relación de cada microorganismo con cada uno de los otros que componen el grupo que se investiga. Los datos se pueden disponer de varias formas, pero la más utilizada es el dendrograma o árbol taxonómico. Un dendrograma es una figura arboriforme, que se asemeja a los árboles genealógicos, con una escala de similitudes que demuestra los niveles de relación en lugares donde se unen las ramas (Pumarola, 1995). Aquellos organismos con características comunes son identificados fácilmente en el dendrograma, debido a los altos porcentajes de similaridad. Con los resultados finales se puede señalar los posibles grupos-especie, en los que existe una probabilidad muy alta de que todos los que se encuentren dentro del mismo, pertenezcan a la misma unidad taxonómica, o sea, a la misma especie.



## 2.2 Fundamentación Filosófica

La presente investigación se basa en el paradigma positivista que tiene como escenario de investigación el laboratorio a través de un diseño pre-estructurado y esquematizado. Su lógica de análisis está orientado a lo confirmatorio, reduccionista, verificación, inferencial e hipotético deductivo mediante el respectivo análisis de resultados. Además de realidad es única y fragmentable

en partes que se pueden manipular independientemente, y la relación sujeto – objeto es independiente. Para este enfoque la realidad es algo exterior, ajeno, objetivo y puede y debe ser estudiada y por tanto conocida.

La creciente destrucción de la biodiversidad ha permitido la aparición de un movimiento *biocentrista*, con énfasis en nuevos paradigmas que sirven de auxilio para detener este problema ambiental y social. La visión *biocentrista* tiene dos tipos de obligaciones, la primera negativa, que evita los daños y riesgos del hombre frente a la biodiversidad, y la segunda positiva, que permite la investigación científica y las aplicaciones tecnológicas para la investigación de los procesos o recursos naturales en peligro. Una nueva visión del mundo o también conocido como *Weltanschauung*, lo que consiste en un dominio responsable del medio ambiente. Esto se basa principalmente en la igualdad del hombre con la naturaleza.

### **2.3 Fundamentación Legal**

La constitución del Ecuador establecida en el 2008 manifiesta cuatro artículos relacionados al tema a investigar:

**Art. 66.-** Se reconoce y garantizará a las personas: Literal 27. El derecho a vivir en un ambiente sano, ecológicamente equilibrado, libre de contaminación y en armonía con la naturaleza.

**Art. 397.-** En caso de daños ambientales el Estado actuará de manera inmediata y subsidiaria para garantizar la salud y la restauración de los ecosistemas. Además de la sanción correspondiente, el Estado repetirá contra el operador de la actividad que produjera el daño las obligaciones que conlleve la reparación integral, en las condiciones y con los procedimientos que la ley establezca. La responsabilidad también recaerá sobre las servidoras o servidores responsables de realizar el control ambiental. Para garantizar el derecho individual y colectivo a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, el Estado se compromete a:

Literal 2. Establecer mecanismos efectivos de prevención y control de la contaminación ambiental, de recuperación de espacios naturales degradados y de manejo sustentable de los recursos naturales.

Literal 3. Regular la producción, importación, distribución, uso y disposición final de materiales tóxicos y peligrosos para las personas o el ambiente.

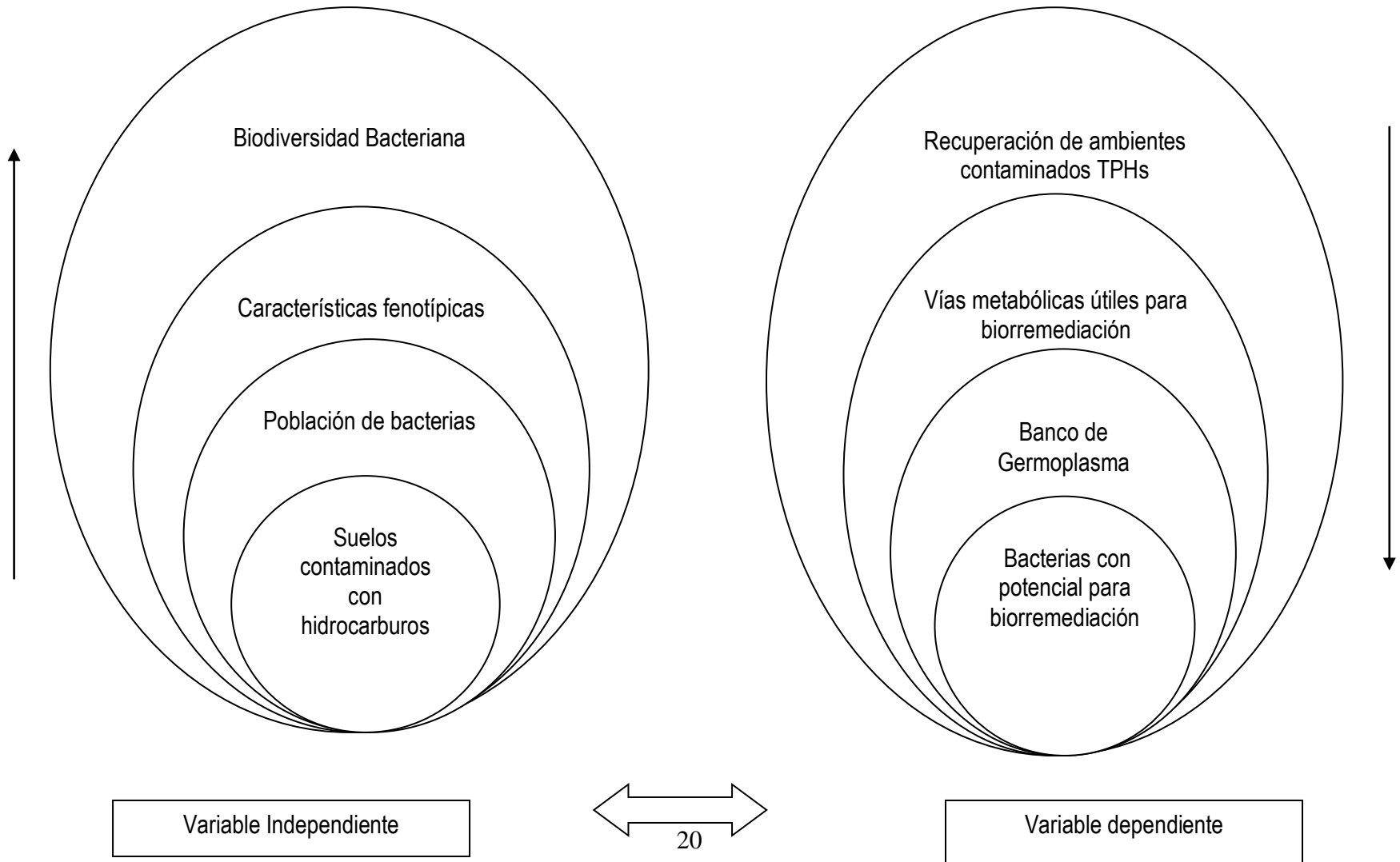
**Art. 409.-** Es de interés público y prioridad nacional la conservación del suelo, en especial su capa fértil. Se establecerá un marco normativo para su protección y uso sustentable que prevenga su degradación, en particular la provocada por la contaminación, la desertificación y la erosión.

Por otra parte existe la Ley para la conservación y uso sustentable de la biodiversidad, la cual afirma:

**Art. 1.-** La Ley para la Conservación y Uso Sustentable de la Biodiversidad tiene por objeto proteger, conservar, restaurar la biodiversidad y regular e impulsar su utilización sustentable; establece los principios generales y normas para la conservación y uso sustentable de la biodiversidad y sus servicios, el acceso a los recursos genéticos, la bioseguridad, la rehabilitación y restauración de ecosistemas degradados y la recuperación de especies amenazadas de extinción, y los mecanismos de protección de los derechos sobre la biodiversidad en materia administrativa, civil y penal.

**Art. 2.-** Para efectos de esta Ley, se entenderá por biodiversidad o diversidad biológica a la variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente y los derivados de los mismos, incluidos: los ecosistemas terrestres y marinos, otros ecosistemas acuáticos y, los complejos ecológicos de los que forman parte; comprende la diversidad dentro de cada especie, entre especies y de los ecosistemas. La biodiversidad ecuatoriana además comprende las especies migratorias que por causas naturales se encuentren en el territorio nacional. La biodiversidad constituye la base del capital natural del país, capaz de proporcionar un flujo constante de bienes y servicios, cuya conservación y utilización sustentable permitan satisfacer las necesidades humanas y garantizar el sustento y la salud de la población.

## 2.4 Categorías fundamentales





## **2.5 Hipótesis**

### **2.5.1. Hipótesis nula**

La biodiversidad de bacterias en ecosistemas terrestres con uso potencial para la biorremediación de hidrocarburos es escasa o pobre.

### **2.5.2. Hipótesis alternante**

En ecosistemas terrestres existe una diversidad biológica abundante de bacterias con uso potencial para la biorremediación de hidrocarburos

## **2.6 Señalamiento de variables de las hipótesis**

- Aislamiento de microorganismos en medios de cultivo.
- Purificación de cepas de bacterias.
- Número de unidades formadoras de colonias de bacterias por gramo de muestra (ufc/g).
- Caracterización fenotípica de los aislamientos selectivos.
- Rango de crecimiento relacionado a temperatura.
- Rango de crecimiento relacionado a pH.
- Rango de crecimiento relacionado a la salinidad
- Diversidad de colonias en los aislamientos.
- Número de aislamientos de bacterias purificadas y almacenadas.

## **CAPITULO III**

### **METODOLOGIA**

#### **3.1 Enfoque**

La presente investigación tuvo un enfoque predominantemente cuantitativo.

#### **3.2 Modalidad básica de la investigación**

Experimental

#### **3.3 Nivel o tipo de investigación**

Básica exploratoria

#### **3.4 Población y muestra**

En la presente investigación se utilizaron 2 muestras de suelos contaminados con hidrocarburos, el primero es un suelo arcilloso con 31.000 ppm de TPHs, y el segundo es un suelo arenoso con 46.000 ppm de TPHs, los dos sirvieron para la determinación de la biodiversidad bacteriana. Las muestras fueron recolectadas en el campo Sacha ubicado en la región Amazónica del Ecuador, transportadas al laboratorio de la FCIAL y almacenadas a temperatura de 10 °C.

#### **3.5 Operacionalización de variables**

| HIPOTESIS                                                                                                                         | VARIABLE                                                                                          | CONCEPTO                                                                                                              | INDICADORES                                                                                                                                                                                                                                                                                   | INDICES                                                                                    | INSTRUMENTOS                                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Biodiversidad de bacterias en ecosistemas terrestres con uso potencial para la biorremediación de hidrocarburos es escasa o nula. | Independiente                                                                                     | Diversidad biológica aislada selectivamente de suelos contaminados con hidrocarburos.                                 | Población microbiana.<br>Grupos especie identificados en los dendrogramas respectivos de acuerdo al porcentaje de similitud.                                                                                                                                                                  | Número de ufc/g.<br>Similitudes mayores al 80% indican miembros de un mismo grupo especie. | Calculadora.<br>Software estadístico.<br>NTSys.<br>Microsoft Excel. |
|                                                                                                                                   |                                                                                                   | Dependiente                                                                                                           | Temperaturas durante las diferentes fases de descomposición.                                                                                                                                                                                                                                  | Temperatura                                                                                | Valores en °C.<br>Valores entre 0 y 14.                             |
|                                                                                                                                   | Cambios de pH durante las diferentes fases de descomposición.                                     |                                                                                                                       | pH<br>Características macroscópicas                                                                                                                                                                                                                                                           | Coloración del micelio del sustrato, esporas y cualquier producción de pigmento difusible. | Microsoft Excel                                                     |
|                                                                                                                                   | Características fenotípicas como producto de la expresión visible de los genes de cada individuo. | Características microscópicas<br>Características fisiológicas de crecimiento a diferentes rangos de temperatura y pH. | Presencia o ausencia de micelio aéreo. Evaluación por código binario. Presencia =1. Ausencia = 0.<br>Tipo de morfología de las cadenas de esporas. Tinción gram.<br>Endosporas y cápsulas.<br>Presencia o ausencia de crecimiento. Evaluación por código binario. Presencia =1. Ausencia = 0. | Microsoft Excel<br>Microscopio<br>Microscopio                                              |                                                                     |

### 3.6 Recolección de Información

#### 3.6.1 Caracterización físico-química de los suelos

##### 3.6.1.1 Contenido de humedad, materia orgánica y conductividad eléctrica

Para la determinación de la humedad se pesó previamente las cápsulas de porcelana y luego se colocó en éstas 5 gramos de suelo de cada una de las muestras (Peso 1). Estas se llevaron a la estufa y se sometió a 105° C por 24 horas. Al retirar las muestras se las dejó enfriar y se procedió a pesar nuevamente (Peso 2).

$$\% \text{ humedad} = \frac{\text{Peso 1} - \text{Peso 2}}{\text{Peso 2}} \times 100$$

Para la determinación de materia orgánica, las muestras procedentes de la estufa (Peso 1) se colocaron en una mufla, a 400° C por 24 horas. Al término de este tiempo se dejó enfriar y finalmente se obtuvo el peso final (Peso 2).

El porcentaje de materia orgánica (%m.o) fue determinado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ m. o} = \frac{\text{Peso 1} - \text{Peso 2}}{\text{Peso 2}} \times 100$$

En la determinación de la conductividad se tomó 5 gramos de muestra de suelo, se colocó en vasos de precipitación con 50ml de agua destilada. Finalmente se realizó las mediciones respectivas de conductividad utilizando el conductímetro digital.

##### 3.6.1.2 pH

Para la determinación del pH de las muestras, se pesaron 10 gramos de suelo, los que fueron colocados en un vaso de precipitación de 100 ml. Luego se añadió 25 ml de agua destilada, y se mezclaron con una cuchara por el lapso de 5 minutos. Las muestras se dejaron en reposo por una hora, y una vez transcurrido ese tiempo, se procedió a tomar las lecturas correspondientes de las muestras, con la ayuda de un pH-metro.

### 3.6.2 Determinación de la población y diversidad bacteriana

Cada una de las muestras de suelo fueron usadas para determinar el número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco (ufc/g) y la diversidad de bacterias. Para ello se usó el método de difusión en placa y diluciones. Para preparar la dilución 1/10 se pesaron 10 gramos de suelo, los que se colocaron en una botella que contenía 90 ml de agua de llave estéril. La suspensión resultante fue agitada por 1 hora. Una vez transcurrido éste tiempo se preparó las diluciones 1/10<sup>2</sup>, 1/10<sup>3</sup>, 1/10<sup>4</sup>, 1/10<sup>5</sup>, 1/10<sup>6</sup> y 1/10<sup>7</sup>. Cien microlitros (100 µl) de las diluciones 1/10<sup>2</sup>, 1/10<sup>3</sup> y 1/10<sup>4</sup> fueron colocados y extendidos por duplicado, sobre la superficie de cajas petri que contenían medio enriquecido con gasolina y petróleo, mientras que en agar nutritivo (ANEXO D), las diluciones que fueron colocadas correspondieron a las de 1/10<sup>5</sup>, 1/10<sup>6</sup> y 1/10<sup>7</sup>, y en GYM y GYEA se colocaron diluciones 1/10, 1/10<sup>2</sup>, 1/10<sup>3</sup>. Todos los medios fueron ajustados el pH a 6.5, y suplementados con nistatin, para evitar el crecimiento de hongos, a una concentración de 75 ug/ml. Las cajas inoculadas fueron incubadas a 28°C por una semana. Luego de la incubación se procedió a contar el número de colonias presentes y diferentes en cada una de las cajas.

Para los medios glucosa extracto de levadura y malta (GYM) y medio Glucosa extracto de levadura (GYEA), y agar petróleo (Anexo D), se procedió a inocular cien microlitros (100 µl) de las diluciones 1/10, 1/10<sup>2</sup> y 1/10<sup>3</sup> de la manera previamente descrita. Los medios GYM y GYEA fueron suplementados con nistatin, a una concentración de 75 ug/ml, y con rifampicina (5 ug/ml), y el pH ajustado a 7. Al agar petróleo solamente se añadió nistatin a la misma concentración usada en el presente estudio para este antibiótico. El pH del medio fue ajustado a 7. Las cajas inoculadas fueron incubadas a 28°C por dos semanas. Luego de la incubación se procedió a contar el número de colonias de bacterias y el número de colonias diferentes presentes en las cajas con medio GYM y GYEA. Para los platos con agar petróleo fue imposible realizar esto, debido a que no era posible visualizar las colonias que crecían sobre la superficie del medio. Estas cajas fueron usadas solamente para aislar en cultivo puro algunas bacterias.

El número de ufc por gramo de suelo fue calculado para aquellas diluciones en las que el número de colonias se encontraban en un rango entre 30 hasta 300, usando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g suelo} = \frac{N \times FD \times Vt}{Vi \times S}$$

Donde:

**N**= Número de colonias

**FD**= Factor de dilución. Dilución en la cual se contó N (Ejemplo: Conteo realizado en la dilución  $1/10^3$ ,  $FD = 1 \times 10^3$ ).

**V<sub>t</sub>**= Volumen de la dilución 1/10, en mililitros

**V<sub>i</sub>**= Volumen inoculado, en mililitros

**S**= Cantidad de suelo utilizada para preparar la dilución 1/10

### **3.6.3 Aislamiento, purificación y almacenamiento de las bacterias aisladas**

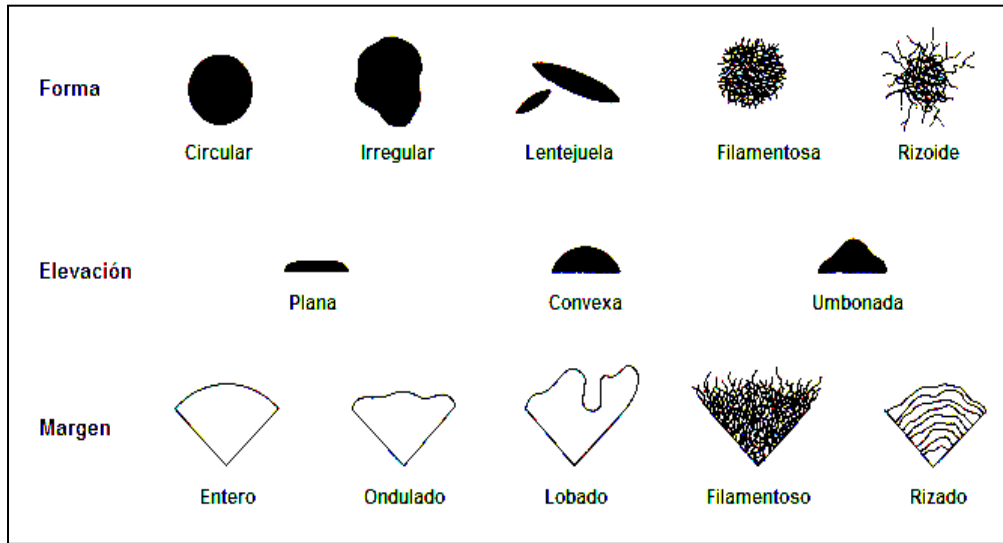
A partir de las colonias diferentes que crecieron en cada uno de los medios de cultivo, se procedió a realizar el aislamiento de las mismas mediante estría simple, en platos que contenían agar nutritivo.

Estos fueron incubados a 28°C por 5 días. Una vez comprobado el crecimiento de cada microorganismo se realizó un repique en cajas petri que contenía agar nutritivo, mediante estría compuesta. Los platos sembrados fueron incubados a 28°C por 5 días. Aquellos que luego del período de incubación presentaron características de cultivo puro, fueron etiquetados y posteriormente almacenados en tubos plásticos que contenían 1 mililitro de glicerol al 20% (w/v) y almacenados a -10°C en un congelador, para su preservación a largo plazo. Al mismo tiempo se preparó un stock en tubos plásticos que contenían 700 microlitros de agua de llave estéril, y almacenados a 4°C en un refrigerador. Estos últimos fueron usados para los diferentes experimentos desarrollados en el estudio. Aquellos que se encuentren contaminados, serán repicados las veces necesarias hasta obtener cultivo puro.

### **3.6.4 Caracterización fenotípica macroscópica de las bacterias aisladas**

Los cultivos puros obtenidos se agruparon de acuerdo a la coloración y morfología de las colonias. Para la determinación del color de la colonia se utilizó una tabla de colores (Anexo F). Las características generales fueron descritas de acuerdo a las características de la Tabla 1.

**Tabla 1. Descripción morfológica de colonias bacterianas de acuerdo a la forma, elevación y margen.**



### 3.6.5 Caracterización microscópica de las bacterias aisladas

Los microorganismos aislados fueron usados para preparar muestras, las cuales se observaron bajo el microscopio. Para las bacterias se determinó tinción de Gram, presencia de esporas y cápsulas.

#### 3.6.5.1 Tinción de Gram.

Se preparó un frotis, secado a temperatura ambiente, este se fijó sobre el mechero, se tiñó por 1 minuto con cristal violeta y luego se lavó con agua destilada, se cubrió con una solución de Lugol durante 1 minuto y nuevamente se lavó con agua destilada y posteriormente con alcohol al 95%, se cubrió con Safranina durante 20 segundos, posteriormente se lavó con agua destilada y finalmente se realizó el secado a temperatura ambiente, luego cada una de las placas se observó al microscopio empezando con el lente de menor aumento hasta terminar con el lente de inmersión.

#### 3.6.5.2 Tinción de endosporas

Fue tomada una pequeña parte del cultivo y se colocó en el portaobjetos, se lo dejó secar al ambiente, luego se colocó sobre una rejilla ubicada sobre un recipiente con agua hirviendo. Se cubrió con verde malaquita durante 10 minutos, añadiendo más colorante en caso de evaporación del mismo sobre la muestra. Luego se lavó con agua destilada para finalmente dar

contraste con safranina durante 1 minuto. Para terminar, se lavó con agua destilada nuevamente y se secó a temperatura ambiente. La presencia de endosporas se determinó usando el lente de inmersión. Las endosporas se tiñeron de verde mientras que el resto de la célula presentó una coloración rojiza.

### 3.6.5.3 Tinción de cápsulas

El frotis que no fue fijado al calor se procedió a teñir con cristal violeta por 2 minutos luego se procedió a lavar el exceso de colorante con una solución de sulfato de cobre al 20% (p/v). La muestra se dejó secar a temperatura ambiente antes de la observación bajo el microscopio usando el lente de inmersión. La presencia de cápsula se determinó mediante la observación de una capa transparente rodeando la célula bacteriana teñida de púrpura.

## 3.6.6 Caracterización bioquímica y fisiológica de los aislamientos

### 3.6.6.1 Rango de crecimiento en función de la temperatura

Se inocularon 3 µl de suspensiones de esporas previamente preparadas, sobre la superficie de agar nutritivo para bacterias. Los platos inoculados fueron incubados a una temperatura de 50°C, 37°C, 28°C y 4°C durante 2, 4 y 5 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluaron las cajas para observar el crecimiento de bacterias, mediante código binario. La bacteria que presentó crecimiento, se le asignó 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0. Además las bacterias que crezcan a temperaturas de 28 a 37°C se las denominaron Mesófilas, a las que crecieron 4 a 37°C se denominaron psicrótrofas y las que crecieron a temperaturas de 4 a 50°C se las llamaron Termófilas.

**Tabla 2. Clasificación de las bacterias en función de la temperatura de crecimiento**

| Temperaturas de incubación en °C |    |    |    | Clasificación |
|----------------------------------|----|----|----|---------------|
| 4                                | 28 | 37 | 50 |               |
| +                                | +  | +  | +  | Termófilas    |
| -                                | +  | +  | -  | Mesófilas     |
| +                                | +  | +  | -  | Psicrótrofas  |



### 3.6.6.2 Rango de crecimiento en función del pH

Se inocularon 3 µl de las suspensiones de esporas en la superficie de agar nutritivo para bacterias, respectivamente, ajustando a los pHs de 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5. El pH se ajustó con la ayuda de sistemas de búferes (Anexo D), para evitar los cambios en el pH debido al metabolismo de los microorganismos. Las cajas se incubaron a 28°C durante 7 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluaron las cajas para observar el crecimiento de las bacterias, mediante código binario. La bacteria que presentó crecimiento, se asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0. Además las bacterias que crecieron a pH 4.5 a 6.5 se las denominaron acidófilas, a las que crecieron en un rango de pH de 5.5 a 7.5 neutrotolerantes, mientras que a las bacterias que crecieron a pH de 6.5 a 7.5 se las denominó neutrófilas.

**Tabla 3. Clasificación de las bacterias según el rango de crecimiento en función del pH**

| pH del medio |     |     |     |     | Clasificación    |
|--------------|-----|-----|-----|-----|------------------|
| 4.5          | 5.5 | 6.5 | 7.5 | 8.5 |                  |
| +            | +   | +   | -   | -   | Acidófilas       |
| -            | +   | +   | +   | -   | Neutrotolerantes |
| -            | -   | +   | +   | -   | Neutrófilas      |

### 3.6.6.3 Rango de crecimiento en función de la salinidad

Se inocularon 3 µl de las suspensiones de esporas en la superficie de agar nutritivo con las siguientes concentraciones de Cloruro de sodio (NaCl) al 1, 5 y 10% (w/v). Las cajas se incubaron a 28°C durante 7 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluaron las cajas para observar el crecimiento de las bacterias, mediante código binario. La bacteria que presentó crecimiento, se asignó 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0. Además se realizó una clasificación en función de la tolerancia a la salinidad, las bacterias que crecieron a concentraciones de salinidad de 1% halófilas débiles y de 1-5% se las denominó halófilas, mientras que a las bacterias que crecieron en concentraciones de NaCl de 1-10% se las clasificó como halófilas extremas.

**Tabla 4. Clasificación de las bacterias según el rango de crecimiento en función del pH del medio.**

| 1 | NaCl (%) |    | Clasificación      |
|---|----------|----|--------------------|
|   | 5        | 10 |                    |
| + | -        | -  | Halófilas débiles  |
| + | +        | -  | Halófilas          |
| + | +        | +  | Halófilas extremas |
| - | -        | -  | No tolerante       |

#### **3.6.6.4 Pruebas de crecimiento en función del hidrocarburo**

Se inocularon 3 µl de suspensiones de esporas previamente preparadas, sobre la superficie de agar enriquecido con gasolina y petróleo para bacterias. Los platos inoculados fueron incubados a una temperatura de 28°C durante 4 y 7 días respectivamente. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluaron las cajas para observar el crecimiento de bacterias, mediante código binario. La bacteria que presentó crecimiento, se le asignó 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0. Además a las bacterias que crecieron solamente en agar enriquecido con gasolina fueron las que utilizaron a la gasolina como fuente de energía, a las que se desarrollaron solamente en medio enriquecido con petróleo fueron la que utilizaron al petróleo como fuente de energía, mientras que a las bacterias que crecieron en los dos medios de cultivo fueron las que utilizaron a la gasolina y petróleo como fuente de energía.

### **3.7. Procesamiento y análisis**

#### **3.7.1 Determinación de la biodiversidad microbiana presente en suelos contaminados con hidrocarburos**

Se realizó el aislamiento selectivo de las bacterias a partir de suelos contaminados con hidrocarburos, mediante pruebas fisiológicas como son rango de crecimiento en función de pH, temperatura, salinidad y finalmente hidrocarburos.

### **3.7.2 Población y diversidad de bacterias**

Se realizó un diseño experimental AxB con dos repeticiones. El factor A estuvo relacionado a las dos muestras de suelos contaminados con hidrocarburos, mientras que el factor B constituyó los diferentes medios de cultivo: Agar nutritivo, medios enriquecidos con hidrocarburos (Petróleo y gasolina) usados en los medios de cultivo, medio GYM y GYEA. El número final de tratamientos se determinó solamente con las bacterias que crecieron sobre los diferentes medios. Los parámetros evaluados fueron la presencia o no de crecimiento.

**Factor A:** Tipo de suelo

**a0:** Suelo Arenoso con 46.000 TPHs

**a1:** Suelo Arcilloso con 31.000 TPHs

**Factor B:** Medio de cultivo

**b0:** Nutritivo

**b1:** Gasolina

**b2:** GYM

**b3:** GYEA

En el factor B se omitió el medio enriquecido con petróleo debido a que fue imposible el conteo de colonias, mientras tanto en las pruebas de crecimiento y fisiológicas si se utilizaron bacterias que crecieron en éste medio. En la tabla 5 se muestran los tratamientos productos de la combinación de los factores en estudios.

**Tabla 5. Tratamientos en estudio**

| Tratamientos | A: Tipo de suelo | B: Medio de cultivo |
|--------------|------------------|---------------------|
| a0b0         | Suelo Arenoso    | Agar nutritivo      |
| a0b1         | Suelo Arenoso    | Agar gasolina       |
| a0b2         | Suelo Arenoso    | GYM                 |
| a0b3         | Suelo Arenoso    | GYEA                |
| a1b0         | Suelo Arcilloso  | Agar nutritivo      |
| a1b1         | Suelo Arcilloso  | Agar gasolina       |
| a1b2         | Suelo Arcilloso  | GYM                 |
| a1b3         | Suelo Arcilloso  | GYEA                |

Los datos fueron analizados con el programa estadístico MSTATC en el cual se determinó el análisis de varianza cuyo esquema se reporta en la Tabla 3. En los casos en que el análisis de varianza mostró diferencias significativas, se realizó la separación de medias mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia.

**Tabla 6. Esquema del análisis de varianza**

| Fuente de variación | Grados de libertad |
|---------------------|--------------------|
| Factor A            | $a - 1$            |
| Factor B            | $b - 1$            |
| Interacción AB      | $(a - 1)(b - 1)$   |
| Error               | $ab(r - 1)$        |
| Total               | $ab(r - 1)$        |

Factor A = Muestras de suelos contaminados con hidrocarburos

Factor B = El número de tratamientos serán los medios de cultivo enriquecidos con hidrocarburos y agar nutritivo.

### 3.7.3 Formación de grupos de color de los microorganismos

Los datos de color de la parte aérea, reverso de la colonia y pigmento difusible fueron usados para agrupar a todos los cultivos similares en los denominados grupos de color. Posteriormente se estableció la homogeneidad de éstos grupos con los resultados de las pruebas fenotípicas.

### 3.7.4 Taxonomía numérica de datos fenotípicos de los microorganismos

Con los resultados de las pruebas fenotípicas se construyó una base de datos, en código binario, con el número de pruebas o características estudiadas. Posteriormente la información fue procesada en el software estadístico NTSys, en el que primeramente se calcularon los porcentajes de similitud entre las bacterias estudiadas. Finalmente, con la ayuda del mismo programa se procedió a obtener un dendrograma basado en la similitud entre los microorganismos. Una vez obtenido éste gráfico, se procedió a identificar los grupos especie basados en un coeficiente de similitud mayor al 90%.

**Tabla 7. Codificación de la información para las pruebas de taxonomía numérica para la determinación de la biodiversidad bacteriana en suelos contaminados con hidrocarburos**

| Número Prueba | Prueba                                   | Descripción           | Código |
|---------------|------------------------------------------|-----------------------|--------|
| 1             | Forma                                    | Circular              | Cir    |
| 2             |                                          | Irregular             | Irr    |
| 3             |                                          | Lentejuela            | Len    |
| 4             |                                          | Filamentosa           | Fil    |
| 5             |                                          | Rizoide               | Riz    |
| 6             | Elevación                                | Plana                 | Pla    |
| 7             |                                          | Convexa               | Con    |
| 8             |                                          | Umbonada              | Umb    |
| 9             | Margen                                   | Entero                | Ent    |
| 10            |                                          | Ondulado              | Ond    |
| 11            |                                          | Lobado                | Lob    |
| 12            |                                          | Filamentoso           | Fia    |
| 13            |                                          | Rizado                | Ria    |
| 14            | Tinción de Gram                          | Positiva              | +      |
| 15            |                                          | Negativa              | -      |
| 16            | Forma microscópica de las colonias       | Cocos                 | Coc    |
| 17            |                                          | Bacilos               | Bac    |
| 18            | Tinción de endosporas                    | Formación endosporas  | End    |
| 19            | Tinción de cápsulas                      | Formación de cápsulas | Cap    |
| 20            | Crecimiento en función de la temperatura | 4°C                   | 4      |
| 21            |                                          | 28°C                  | 28     |
| 22            |                                          | 37°C                  | 37     |
| 23            |                                          | 50°C                  | 50     |
| 24            | Crecimiento en función del pH            | pH 4.5                | 4.5    |
| 25            |                                          | pH 5.5                | 5.5    |
| 26            |                                          | pH 6.5                | 6.5    |
| 27            |                                          | pH 7.5                | 7.5    |
| 28            |                                          | pH 8.5                | 8.5    |

Tabla 7. Continuación...

|    |                                        |                                                      |          |
|----|----------------------------------------|------------------------------------------------------|----------|
| 29 |                                        | 1% (p/v)                                             | 1        |
| 30 | Crecimiento en función de la salinidad | 5% (p/v)                                             | 5        |
| 31 |                                        | 10% (p/v)                                            | 10       |
| 32 |                                        | Crecimiento en medios enriquecidos con hidrocarburos | Petróleo |
| 33 | Gasolina                               |                                                      | Gas      |
| 34 | Comprobación de crecimiento            | Agar nutritivo                                       | Nut      |
| 35 | Formación de grupos de color           | Lavanda                                              | Lav      |
| 36 |                                        | Amarillo                                             | Ama      |
| 37 |                                        | Amarillo limón                                       | Aml      |
| 38 |                                        | Amarillo canario                                     | Amc      |
| 39 |                                        | Verde manzana                                        | Vem      |
| 40 |                                        | Amarillo oro                                         | Amo      |
| 41 |                                        | Amarillo canario claro                               | Acc      |
| 42 |                                        | Salmón                                               | Sal      |
| 43 |                                        | Melocotón claro                                      | Mec      |
| 44 |                                        | Traslucido melocotón                                 | Trm      |
| 45 |                                        | Incoloro crema                                       | Inr      |
| 46 |                                        | Traslúcido                                           | Tra      |
| 47 |                                        | Traslúcido blanco                                    | Trb      |
| 48 |                                        | Traslúcido crema                                     | Trc      |
| 49 |                                        | Mandarina                                            | Man      |
| 50 |                                        | Amarillo claro                                       | Amr      |
| 51 |                                        | Marfil claro                                         | Mac      |
| 52 |                                        | Beige claro                                          | Bec      |
| 53 |                                        | Coral                                                | Cor      |
| 54 |                                        | Rosa                                                 | Ros      |
| 55 |                                        | Mandarina claro                                      | Mad      |
| 56 |                                        | Amarillo cadmio                                      | Amd      |
| 57 |                                        | Blanco                                               | Bla      |
| 58 |                                        | Coral translucido                                    | Cot      |
| 59 |                                        | Marfil                                               | Mar      |
| 60 |                                        | Cristal                                              | Cri      |
| 61 |                                        | Traslúcido rosate                                    | Trr      |
| 62 |                                        | Ocre oro                                             | Ocr      |
| 63 |                                        | Amarillo limón claro                                 | Alc      |
| 64 |                                        | Naranja                                              | Nar      |
| 65 |                                        | Traslúcido crema claro                               | Tcc      |
| 66 |                                        | Beige                                                | Bei      |
| 67 |                                        | Beige translúcido                                    | Bet      |
| 68 |                                        | Amarillo piel                                        | Amp      |
| 69 |                                        | Amarillo canario translucido                         | Act      |

**Tabla 7. Continuación...**

|    |  |                               |     |
|----|--|-------------------------------|-----|
| 70 |  | Traslucido amarillo           | Tra |
| 71 |  | Salmón claro                  | Sac |
| 72 |  | Amarillo cadmio<br>traslucido | Adt |
| 73 |  | Amarillo cadmio claro         | Adc |
| 74 |  | Coral claro                   | Coc |
| 75 |  | Incoloro                      | Inc |
| 76 |  | Melocotón                     | Mel |
| 77 |  | Marfil traslúcido             | Mat |
| 39 |  | Plata                         | Pla |

## CAPITULO IV

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1 Análisis de los Resultados.

##### 4.1.1 Caracterización físico-química de los suelos

En la Tabla A1 (Anexo A), se muestran los valores de humedad, materia orgánica, conductividad eléctrica y pH de las dos muestras de suelos.

##### 4.1.2 Determinación de la población y diversidad bacteriana

El conteo del número de colonias y colonias diferentes de bacterias por dilución y por medio de cultivo se presentan en las Tablas A2 y A3 (Anexo A). La Tabla A4 (Anexo A), muestra el número de unidades formadoras por gramo de suelo seco. No se presentan valores de los resultados obtenidos en el medio de cultivo enriquecido con petróleo debido a que fue imposible el conteo de colonias, y por lo tanto los resultados fueron excluidos en esta parte del estudio. El análisis de varianza del número de ufc/g de suelo seco se presenta en la Tabla B1 (Anexo B), el mismo que reveló la existencia de diferencias altamente significativas para el factor A (Tipo de suelo), factor B (Medios de cultivo.) y la interacción AxB (Tipo de suelo + Medios de cultivo). Por la existencia de solamente dos niveles en el Factor A (suelo arcilloso y arenoso), no se realizó la separación de medias usando Tukey, ya que es evidente que un nivel va a ser mayor al otro. El factor a0 (Suelo arenoso) presentó el mayor número de ufc/g de suelos seco ( $1.05 \times 10^{11}$ ), mientras que el factor a1 (suelo arcilloso) fue el más bajo ( $8 \times 10^6$ ). La prueba de Tukey al 5% de significancia para el Factor B (Medios de cultivo) que se presenta en la Tabla B2, Anexo B, mostró que todos los niveles fueron diferentes, en donde el valor mayor de ufc/g de suelo seco se obtuvo en el medio de cultivo agar nutritivo ( $b_0$ ;  $2.09 \times 10^{11}$  ufc/g), y el menor para GYEA ( $b_2$ ;  $6.45 \times 10^7$  ufc/g).

Igualmente en la Tabla B3 (Anexo B) se muestra la separación de medias mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia para la interacción AB (Tipo de suelo + medios de cultivo). Los resultados indican que el tratamiento  $a_0b_0$  (Suelo arenoso + Agar nutritivo) con  $4.19 \times 10^{11}$  ufc/g de suelo seco se encuentra en el primer nivel, mientras que en la población más baja fue calculada para el tratamiento  $a_1b_2$  (Suelo arcilloso + Agar GYEA) con  $5.13 \times 10^3$  ufc/g de suelo seco. Este experimento presentó un coeficiente de variación de 8.07%.



En lo que se refiere a la diversidad de colonias de bacterias presentes en los platos de aislamiento, el análisis de varianza se presenta en la Tabla B4 (Anexo B), el mismo que reveló que en el Factor A (Tipo de suelo), no existen diferencias estadísticas significativas. Sin embargo el suelo arenoso presentó mayor diversidad con 9 colonias diferentes y en el suelo arcilloso menor diversidad con 5 colonias diferentes. Para el Factor B (Medios de cultivo) y en la interacción AB (Tipo de suelo + medios de cultivo), si existen diferencias altamente significativas. Debido a ello, se procedió a realizar la prueba de Tukey al 5% de significancia. En lo que respecta al Factor B (Tabla B4, Anexo B), los niveles b0 y b1 comparten el mismo nivel de significancia, sin embargo, mayor diversidad existe en b0 (10 colonias). La diversidad más baja fue encontrada para los platos de aislamiento con el medio de cultivo GYEA (b<sub>2</sub>; 4 colonias). Igualmente la Tabla B4 (Anexo B) muestra la separación de medias de la interacción AB (Tipo de suelo + medios de cultivo), en donde la mayor diversidad de colonias bacterianas fue encontrada en los tratamientos a<sub>1</sub>b<sub>0</sub> (14 colonias) y a<sub>0</sub>b<sub>1</sub> (11 colonias), los que compartieron el mismo nivel de significancia estadística. La menor diversidad se presentó en el suelo arcilloso y medio GYEA (a<sub>1</sub>b<sub>2</sub>; 3 colonias).

#### **4.1.3 Purificación y almacenamiento de los microorganismos aislados**

A partir de los platos de aislamiento se procedió a aislar en cultivo puro ochenta y dos bacterias, las que fueron almacenadas como stocks de glicerol y almacenadas en condiciones de congelamiento (-1°C). Para ésta parte del experimento se aislaron bacterias que crecieron en el medio petróleo. Es necesario anotar que, en los platos con agar nutritivo, existió crecimiento de hongos, a pesar de que el medio contenía un compuesto antifúngico como es nistatin. Este hecho no se observó en ningún medio de aislamiento. Luego de dos meses de almacenamiento, a partir de los stocks no fue posible recuperar células viables para nueve cultivos, los que fueron excluidos de la presente investigación. El número final de bacterias estudiadas fue de setenta y tres.

La Figura C1, (Anexo C), muestra que la mayoría de bacterias fueron aisladas del suelo arenoso (44) y un menor número del suelo arcilloso (29). La Figura C2, (Anexo C), muestra a las setenta y tres bacterias aisladas de las cuales se obtuvo que once bacterias crecieron en agar nutritivo, una en GYM y cinco en GYEA, mientras que en los medios enriquecidos con hidrocarburos se observa claramente que la mayoría de bacterias fueron aisladas en estos medios (gasolina, 25) y (petróleo, 31).

#### **4.1.3.1 Aislamiento selectivo de bacterias a partir de Suelo Arenoso con 46.000 TPHs**

En la Tabla A5 (Anexo A) se muestra la codificación de las cuarenta y cuatro bacterias aisladas a partir de la muestra de suelo arenoso. En agar nutritivo se obtuvieron seis bacterias. En medio enriquecido con gasolina se obtuvieron catorce bacterias, en medio enriquecido con petróleo obtuvieron diez y ocho bacterias, una sola bacteria en medio GYM y finalmente cinco bacterias en medio GYEA (Figura C3, Anexo C).

#### **4.1.3.2 Aislamiento selectivo de bacterias a partir de Suelo Arcilloso con 31.000 TPHs**

En la Tabla A6 (Anexo A) se registra la codificación de las veinte y nueve bacterias aisladas. En agar nutritivo se obtuvieron cinco bacterias, en medio enriquecido con gasolina se obtuvieron once bacterias, en medio enriquecido con petróleo obtuvieron trece bacterias, mientras que en medio GYM y GYEA no se logró aislar ninguna bacteria (Figura C4, Anexo C).

#### **4.1.4. Caracterización macroscópica de los cultivos bacterianos**

En la Tabla A7 (Anexo A), se muestra la formación de cuarenta y cuatro grupos, basados en el color de la colonia. El mayor número de miembros encontrado para los diferentes grupos fue de cinco integrantes. Los grupos 6 y 8 fueron los que presentaron esta característica. También es notorio que, colores únicos fueron encontrados para 29 bacterias, las que fueron ubicadas como miembros individuales. El resto de grupos presentaron entre dos a cuatro integrantes. El color más repetido fue el amarillo, seguido de las tonalidades traslúcidas. En la Tabla A8 (Anexo A), se describe la forma, elevación y margen de los diferentes miembros de los grupos de color siendo la forma circular la predominante en 26 grupos, y la irregular en menor cantidad con 18 grupos. La elevación que se presenta en más grupos es la plana en 32 grupos, mientras que la convexa en 12 grupos. Finalmente el margen entero se presenta en 25 grupos y el ondulado en 19 grupos.

#### **4.1.5 Caracterización microscópica de los cultivos bacterianos**

La Tabla A9 (Anexo A), muestra los resultados de la caracterización microscópica para las setenta y tres bacterias utilizadas en el estudio. En lo referente a la forma de las bacterias, cincuenta y dos fueron identificadas como cocos y veinte y un bacterias como bacilos (Figura C5, Anexo C). Además la Tabla A10 (Anexo A), presenta los resultados de la forma de los cultivos bacterianos en relación de la muestra de suelo usada para el aislamiento, de los cuales en el suelo arenoso se encontraron que la mayoría de bacterias con forma de cocos (38) y seis

bacilos, mientras que en el suelo arcilloso la distribución de cocos y bacilos es uniforme (14 y 15). También la Tabla A11 representa los resultados la forma de las bacterias según el medio de cultivo utilizado para los aislamientos, en los medios enriquecidos con hidrocarburos se observa una distribución uniforme así, en agar gasolina se recuperaron diecinueve cocos y seis bacilos, mientras que en agar petróleo veinte y dos cocos y nueve bacilos.

En lo que se refiere a la tinción de Gram, treinta y un bacterias presentaron una tinción de Gram negativa, mientras que cuarenta y un bacterias fueron Gram positivas. Solamente para una bacteria no se pudo determinar la reacción de Gram de su pared (Figura C6, Anexo C). Además la Tabla A12 (Anexo A) muestra la tinción de Gram, presencia de cápsulas y endosporas de las bacterias según el origen de las muestras. No se encontró uniformidad en los resultados ya que para la muestra de suelo arenoso, la mayoría fueron bacterias Gram negativas, mientras que lo contrario se observó en el suelo arcilloso. En relación al medio de aislamiento, el número de bacterias Gram positivas fue mayor en casi todos los medios (Tabla 13, Anexo A). La única excepción fue para agar nutritivo, en donde el mayor número de bacterias fueron Gram negativas.

Para la presencia o ausencia de cápsulas (Figura C7, Anexo C), se registró que ocho bacterias no poseen cápsulas, mientras que sesenta y cinco lo hicieron. Al analizar el número de bacterias que presentaron cápsulas, según el tipo de suelo utilizado para su aislamiento, a partir del suelo arenoso se aislaron treinta y nueve, mientras que en el suelo arcilloso veinte y seis (Tabla A12, Anexo A), la fracción que presentó cápsulas es prácticamente la misma en los dos tipos de suelo. LA misma tendencia se encontró para el número de bacterias aisladas según el medio de cultivo (Tabla A13, Anexo A). Finalmente, solo un bacilo Gram positivo presentó endosporas.

#### **4.1.6. Caracterización bioquímica y fisiológica de los aislamientos**

##### **4.1.6.1 Rango de crecimiento en función de la temperatura**

La Tabla A14 (Anexo A), muestra los resultados del rango de crecimiento en función de la temperatura, representado con código binario. Cuarenta y cuatro bacterias fueron ubicadas como mesófilas, seguidas por las psicrótrofas (veinte y siete). Finalmente el número más bajo fue encontrado en las bacterias termófilas (Figura C8, Anexo C). Por otro lado, en la Tabla A15 (Anexo A), se registra el número de los microorganismos según la temperatura de crecimiento, por tipo de suelo, existiendo una distribución uniforme en los dos tipos de suelos al hablar de bacterias mesófilas. En lo referente a las bacterias psicrótrofas, en el suelo arenoso se pudo

aislar un número significativamente mayor que a partir del suelo arcilloso. En lo referente a la relación del número de aislamientos en función del medio de cultivo, la mayoría de bacterias mesófilas fueron recuperadas de los medios suplementados con hidrocarburos. Para el resto de medios, la distribución fue variable, e incluso en algunos medios no se registró el aislamiento de bacterias termófilas o psicrótrofas (Tabla A16, Anexo A).

#### **4.1.6.2 Rango de crecimiento en función del pH**

La Tabla A17 (Anexo A), muestra los resultados del rango de crecimiento en función del pH, de las setenta y tres bacterias utilizadas en el estudio, representado con código binario. De las cuales cuarenta y una bacterias presentaron características neutrotolerantes, seguidas de las treinta bacterias neutrófilas y solamente dos bacterias acidófilas (Figura C9, Anexo C). De todas las bacterias neutrotolerantes, la mayoría fueron aisladas de suelos arenosos (treinta), que de suelos arcillosos (once). En relación a las neutrófilas, la distribución fue prácticamente uniforme, ya que del suelo arenoso se recuperaron catorce aislamientos, mientras que del arcilloso se aislaron dieciséis cultivos (Tabla A18, Anexo). De acuerdo al medio de cultivo utilizado para los aislamientos, la mayoría de neutrófilos y acidófilos fueron encontrados en los medios enriquecidos con hidrocarburos (Tabla A19, Anexo A), tendencia similar a la observada para las pruebas de temperatura. Todos los cultivos de bacterias acidófilas fueron aisladas a partir de agar petróleo.

#### **4.1.6.3 Rango de crecimiento en función de la salinidad**

En la Tabla A20 (Anexo A) se muestra los resultados de las pruebas de resistencia a salinidad, en código binario. La mayoría de bacterias presentó características de resistencia a salinidad, en donde se obtuvo que la mayoría de bacterias presentaron características halófilas (Figura C10, Anexo C). El menor número fue encontrado para las bacterias no tolerantes. De las cuarenta y seis bacterias halófilas, treinta y ocho fueron aisladas del suelo arenoso y solamente ocho del suelo arcilloso. De las catorce bacterias halófilas débil trece fueron aisladas del suelo arcilloso y sólo una en el suelo arenoso. Las halófilas extremas presentaron una distribución uniforme en las dos muestras de suelo y las cuatro bacterias no tolerantes fueron procedentes de la muestra de suelo arcilloso (Tabla A21, Anexo A). Por otro lado, al comparar el número de bacterias aisladas en función del medio de cultivo utilizado para los aislamientos, se tiene que las bacterias halófilas débiles, y las extremas tienen una distribución uniforme. De las cuarenta y seis bacterias halófilas encontradas cinco se aislaron del medio agar nutritivo, cuatro el GYEA y una en GYM, mientras que el agar gasolina y petróleo presentaron uniformidad (17 y 19). De las

cuatro bacterias que no toleran NaCl, tres fueron aisladas del medio enriquecido con petróleo y una del medio enriquecido con gasolina (Tabla A22, Anexo A).

#### **4.1.6.4 Pruebas de crecimiento en función de hidrocarburos**

La Tabla A23 (Anexo A) señala en código binario el crecimiento y no crecimiento en agar enriquecido con petróleo y gasolina de setenta y tres bacterias. En la Figura A24, Anexo A, de las cuales dos bacterias no toleran ninguno de los dos hidrocarburos, una bacteria utiliza solamente a la gasolina como fuente de carbono y otra bacteria sólo al petróleo. En la Figura C11 y C12 (Anexo C), se muestra el número de bacterias que crecieron en el medio enriquecido con petróleo y las que crecieron en medio enriquecido con gasolina, obteniéndose en ambos casos una distribución uniforme, donde predomina el crecimiento de los microorganismos aislados. De acuerdo a la Tabla A24, (Anexo A), se puede observar que la mayoría de bacterias crecen en presencia de los dos hidrocarburos, siendo cuarenta y cuatro las bacterias procedentes de suelo arenoso y veinticinco bacterias procedentes del suelo arcilloso. Dos bacterias no crecieron en gasolina y petróleo, a pesar de haber sido aisladas en medio enriquecido con petróleo (Tabla A25, Anexo A).

#### **4.1.7 Taxonomía numérica de datos fenotípicos.**

El dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de simple coincidencia ( $S_{SM}$ ), calculado a partir de pruebas fenotípicas de las bacterias aisladas en este estudio se muestra en la Figura C13 (Anexo C), mientras que la matriz utilizada para su elaboración se presenta en la Tabla A27 (Anexo A). La definición de grupos especie se realizó al 90% de similaridad. Las setenta y tres bacterias estudiadas formaron ocho grupos especie, de los cuales, cinco presentaron más de un miembro. El grupo 1 es el más numeroso con treinta y ocho miembros, seguido por el grupo 4 que tuvo quince miembros, el grupo 3 con siete miembros y el grupo 6 y 7 con cinco miembros, mientras tanto los grupos 2, 5 y 8 están formados por un solo miembro (Tabla A26, Anexo A).

### **4.2 Interpretación de Datos**

#### **4.2.1. Población y diversidad bacteriana**

El número de unidades formadoras de colonias o ufc por gramo de suelo seco en cada uno de los tratamientos mostró resultados contrastantes, ya que las diferencias en las poblaciones fueron extremas. En el suelo arenoso, el número de bacterias presentes en el suelo fue más de 10000 veces mayor que en el suelo arcilloso. Hay que recalcar que el mayor número de TPHs

fueron encontrados en el suelo arenoso. Es probable que la diferencia tan grande en número se deba a que los microorganismos presentes en el suelo arenoso se hayan adaptado completamente a las condiciones, y solamente hayan sobrevivido los que tienen capacidad biodegradadora. Este razonamiento tiene fundamento ya que como se pudo observar en los resultados posteriores la mayoría de microorganismos que presentaron características biodegradadoras fueron aislados de medios que contenía petróleo o sus derivados, (Figura C2, Anexo C), y provenientes del suelo arenoso, (Figura C1, Anexo C). Además, es necesario recalcar que las características físico-químicas de los suelos podrían haber influido en los resultados obtenidos de la presente investigación. Al hacer la comparación de la cantidad de materia orgánica, pH y conductividad, se hace evidente que mejores condiciones para crecimiento existieron en el suelo arenoso, por el mayor contenido de materia orgánica y un pH cercano a la neutralidad, condiciones similares que se realizaron con las condiciones de aislamiento. Entonces si bien es cierto que numéricamente tenemos diferencias abismales entre las poblaciones bacterianas de los dos tipos de suelo, es necesario señalar que se debe necesariamente tomar en cuenta que existe una posibilidad de que el pH del medio de los medios de aislamiento, que fue de 6.5 (neutro) es completamente diferente al pH del suelo arcilloso que fue de 4.99, que es evidentemente un pH ácido, sería bueno realizar experimentos posteriores, ajustando el pH del medio de aislamiento a 5, lo que probablemente permitiría aumentar el número de ufc/g de suelo, y lo que probaría los argumentos de la presente discusión.

#### **4.2.2 Caracterización macroscópica**

A partir de los platos de aislamiento en lo que ya se incluyó los resultados de agar petróleo, se aislaron 73 bacterias. Es evidente en el presente estudio de que bacterias similares sean aisladas en los diferentes medios, por ello se realizó una agrupación preliminar que agrupó a las 73 bacterias en 44 grupos de color basados en la pigmentación general de la colonia. Es evidente que la tabla de colores utilizada presentó variaciones ligeras en las coloraciones de los colores principales. Por ejemplo, el color amarillo presentó 13 tonalidades diferentes, y evidentemente eso hizo que la agrupación se disperse notoriamente. Este razonamiento es tan válido que al realizar el análisis mediante taxonomía numérica de datos fenotípicos se encontró que las 73 bacterias estaban divididas en 8 grupos diferentes.

### **4.2.3 Caracterización Fenotípica**

En la clasificación general la mayoría de las bacterias presentaron la forma de cocos y presencia de cápsulas. Morfológicamente las colonias bacterianas difieren de una especie a otras pero resulta poco variada puesto que pueden diferenciarse claramente a los cocos y bacilos como explica García *et al.*, (s/f). Además fue interesante observar que la mayor cantidad fueron bacterias Gram positivas, lo que indicaría un cambio, de lo que comúnmente reporta la literatura, ya que principalmente son bacterias Gram negativas las más estudiadas como agentes de biorremediación. Según Bedoya *et al.*, (2007), las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa compuesta por peptidoglicano, lo que permite que estas células sean más resistentes y rígidas a factores externos, lo que puede ser la respuesta para que estas bacterias sobrevivan por mucho tiempo en estos suelos. Será necesario realizar estudios posteriores sobre la identificación molecular de los representantes obtenidos por taxonomía numérica para así establecer la ubicación taxonómica de las bacterias aisladas en la presente investigación.

### **4.2.4 Pruebas Fisiológicas**

#### **4.2.4.1 Rango de crecimiento en función de la temperatura**

Todas las bacterias utilizadas en el presente estudio fueron aisladas de suelos contaminados con residuos de petróleo. Así mismo, los resultados obtenidos en las pruebas fisiológicas relacionadas a temperatura indican las características del lugar de donde provienen las bacterias. Es necesario recordar que el suelo de dónde se aislaron los microorganismos, recolectado en el campo Sacha, se encuentra ubicado en la región Amazónica por lo que fue posible encontrar en la clasificación general que la mayoría de bacterias son mesófilas soportando temperaturas de 28 a 37°C, así mismo dos bacterias termófilas que soportaron temperaturas de 4 y 50°C siendo un gran rango de crecimiento. Estas bacterias podrían ser utilizadas potencialmente en otros lugares en donde existen sitios para biorremediación en la región Amazónica y Sierra debido a los rangos de crecimiento. Pero un resultado aún de mayor significancia es que la misma bacteria termófila que creció hasta 50°C, posee endosporas lo que le permitiría adaptarse y sobrevivir en ambientes extremos.

#### **4.2.4.2 Rango de crecimiento en función del pH**

En la clasificación general se obtuvo que la mayoría de bacterias son neutrotolerantes seguidas por las bacterias neutrófilas. En la clasificación por tipo de suelo del cual fueron aislados se tiene la mayor cantidad de neutrófilos en el suelo arcilloso, neutrotolerantes en el suelo arenoso y acidófilos en el suelo arcilloso. Una vez más es necesario relacionar estos resultados a las características físico-químicas, relacionadas al pH de los suelos, y conjuntamente con el pH de los medios de aislamiento, lo que, como se dijo anteriormente son neutros. Como se indica en la investigación realizada en PEPDA, se observó un rango de crecimiento importante de los microorganismos aislados de suelos contaminados con petróleo, que va desde pH 6 a 7, siendo el pH 7 (neutro) donde se encontró un elevado número de colonias.

#### **4.2.4.3 Rango de crecimiento en función de la salinidad**

Así mismo, en las pruebas de salinidad se obtuvo que la mayoría de bacterias fueron halófilas, pero también existieron bacterias que crecieron en concentraciones más altas y bajas de sal y otras no tolerantes. Según García, (s/f), en forma general las bacterias toleran las variaciones de la presión osmótica, se puede inhibir el crecimiento de las bacterias si se colocan en el medio concentraciones mayores al 2% de NaCl, cuando esto sucede se produce una pérdida de agua en la célula, dañándose así la membrana, esto se lo conoce como plasmólisis. Como se muestra en la Tabla A21 (Anexo A), un mayor número de halófilos fueron recuperados del suelo arenoso. Es evidente que si comparamos este resultado con la conductividad de cada uno de los suelos (Tabla A1, Anexo A), podemos concluir claramente que existe una relación directa entre el número de halófilos y la conductividad del suelo, ya que en el suelo arenoso tiene una conductividad 40 veces mayor que la del suelo arcilloso.

#### **4.2.4.4 Rango de crecimiento en función de hidrocarburos**

Los resultados obtenidos que la mayoría de bacterias tienen características biodegradadoras ya que prácticamente todas las bacterias crecieron en los dos medios utilizados y las única fuente de carbono fueron gasolina y petróleo. Existe la posibilidad de que algunas de estas bacterias tengan un potencial enorme para ser usadas en programas de biorremediación de suelo contaminados con petróleo también es necesario recalcar que la metodología utilizada en la presente investigación, es la adecuada para buscar bacterias con potencial para biorremediación. Como la mayoría de bacterias presentaron crecimiento en los dos hidrocarburos utilizados, se comprobaría que las bacterias aisladas de suelos contaminados



utilizan los hidrocarburos como fuente de energía y al ser llevados a medio de cultivo enriquecido con petróleo y gasolina, continuaron con su metabolismo.

En la clasificación por tipo de suelo se obtuvo la mayoría de bacterias que toleran a los dos hidrocarburos están en el suelo arenoso, este resultado es muy interesante debido a que este suelo es el que tenía la mayor cantidad de TPHs. Así mismo, la mayoría de bacterias fueron aisladas de los medio que contenían gasolina y petróleo, por lo que los resultados de ésta parte del experimento guardan congruencia.

#### **4.2.5. Taxonomía numérica de datos fenotípicos**

Los 8 grupos formados a partir de las 73 bacterias aisladas, demuestran existe diversidad fenotípica, y contrasta significativamente con los 44 grupos preliminares obtenidos en los grupos de color. Es evidente que el análisis de 78 pruebas fenotípicas es más robusto que la agrupación por la pigmentación de colonia realizada al inicio de la investigación. Es probable que algunos de éstos grupos especie correspondan a nuevas especies de bacterias biorremediadoras. A futuro se necesitarán estudios moleculares que complementen este estudio para la demostración si éstas bacterias existen o no, principalmente el secuenciamiento del gen del ARNr 16S, de la subunidad pequeña del ribosoma 70S de los procariotes. Ese será un resultado concluyente acerca de lo que posiblemente se ha encontrado en el presente estudio, en términos de la diversidad fenotípica que podrá ser correlacionada con la diversidad genética de las especies identificadas o clasificadas, según el caso.

#### **4.2.6. Discusión general del trabajo investigativo**

El presente estudio se orientó en la determinación de la biodiversidad bacteriana en muestras de suelos contaminados con hidrocarburos procedentes del campo Sacha ubicado en la región amazónica. Con el fin de obtener buenos resultados se logró encontrar el método adecuado de aislamiento selectivo tomando en cuenta principalmente dos factores como son el origen de la muestra y el medio de cultivo. Cuando se habla de aislamiento selectivo es posible obtener microorganismos completamente iguales y muchos de ellos, se logró establecer una metodología científicamente comprobada para encontrar y seleccionar los cultivos con características fenotípicas diferentes.

En esta investigación se aislaron inicialmente ochenta y dos cultivos puros, de los cuales, las pruebas bioquímicas y fisiológicas se procedieron a realizar de setenta y tres, puesto que luego de dos meses de almacenamiento, no fue posible recuperar células viables de nueve cepas a partir de los stocks por lo que se excluyeron del estudio. Además las bacterias con características de actinomicetes fueron excluidos del estudio debido a su escaso crecimiento en los medios de cultivo.

La mayoría de los cultivos aislados fueron procedentes del suelo arenoso con un 60% de los microorganismos, mientras que el otro 40% fue procedente del suelo arcilloso, lo que se responde con las características físico-químicas de los suelos, puesto que el arenoso presentó mayor conductividad y materia orgánica, lo que demuestra que los dos parámetros están relacionados directamente a los TPHs presentes en cada una de las muestras de suelo arenoso con 46.000 y suelo arcilloso con 31.000. Probablemente estos parámetros influyeron directamente tanto en las poblaciones de bacterias como en la diversidad de las mismas.

Además la mayoría de los aislamientos obtenidos son procedentes de los medios enriquecidos con hidrocarburos, puesto que en el medio agar nutritivo existió la presencia de hongos a pesar de haber colocado nistatin (poderoso antifúngico) y dificultó un poco su aislamiento. Los parámetros medidos fueron el número de bacterias diferentes que crecieron en cada plato y el número de ufc/gramo de suelo seco, además de la presencia o ausencia de crecimiento en los diferentes medios de cultivos preparados para las pruebas fisiológicas.

Los resultados alcanzados demuestran que las bacterias estudiadas presentan una gran diversidad y sobretodo que pueden utilizar al petróleo o sus derivados como fuente de energía, hecho que se manifiesta en la capacidad que casi todas las bacterias presentaron crecimiento en los medios enriquecidos con petróleo y gasolina. Existe una bacteria el único miembro del grupo 8 (TG122) que fue capaz de desarrollar endosporas y crecer hasta en temperatura de 50°C, siendo esta una posible bacteria bioremediadora que podría ser utilizada en ambientes extremos.

La posibilidad de encontrar nuevas especies de bacterias biodegradadora es bastante alta debido a su crecimiento en medios enriquecidos con hidrocarburos como gasolina y petróleo. Pero por otro lado se debe seguir investigando y realizar pruebas de degradación de hidrocarburos que es una de las investigaciones que se podrían derivarse de los resultados obtenidos.

### **4.3 Verificación de Hipótesis.**

#### **4.3.1 Hipótesis para la determinación de la biodiversidad de bacterias presentes en suelos contaminados con hidrocarburos.**

##### **4.3.1.1 Hipótesis nula ( $H_0$ ).**

La biodiversidad de bacterias en ecosistemas terrestres con uso potencial para la biorremediación de hidrocarburos es escasa o pobre.

##### **4.3.1.2 Hipótesis alternante ( $H_1$ ).**

Diversidad biológica abundante de bacterias en ecosistemas terrestres con uso potencial para la biorremediación de hidrocarburos

Luego de analizar los resultados de la determinación de la biodiversidad de bacterias presentes en suelos contaminados con hidrocarburos de setenta y tres bacterias utilizadas en el presente estudio, “se acepta la hipótesis alternante ( $H_1$ )” afirmando que existe diversidad biológica abundante de bacterias en ecosistemas terrestres con uso potencial para la biorremediación de hidrocarburos luego del análisis individual de los datos.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

El mayor número de ufc/g de suelo seco se encontró en el suelo arenoso con un pH de 6.4 ( $1.05 \times 10^{11}$ ), mientras que en el suelo arcilloso con un pH de 5 fue más bajo ( $8 \times 10^6$ ), siendo 10000 veces mayor en el suelo arenoso que en el arcilloso. En el medio agar nutritivo se obtuvo el valor más alto  $2.09 \times 10^{11}$ , mientras que en el GYEA el menor número de ufc/g de suelo seco que fue de  $6.45 \times 10^7$ , finalmente el mejor tratamiento fue el conformado por el suelo arcilloso + medio agar nutritivo con un valor de  $4.19 \times 10^{11}$ , y en el que se obtuvo menor número de ufc/g de suelo seco se obtuvo en el tratamiento suelo arcilloso + agar GYEA con  $5.13 \times 10^3$ .

Se aislaron 73 bacterias a partir de las dos muestras de suelos utilizadas y posteriormente utilizadas para las diferentes pruebas fenotípicas. Aunque inicialmente se obtuvieron 82 bacterias, luego de dos meses de almacenamiento, a partir de los stocks no fue posible recuperar células viables para 9 cultivos, los que fueron excluidos de la presente investigación.

El número de bacterias aisladas a partir del suelo arenoso fue más alta con 44 representantes, mientras que en suelo arcilloso solamente se obtuvieron 29 bacterias. En los aislamientos realizados en los diferentes medios de cultivo, se obtuvo en agar enriquecido con petróleo 31 bacterias, Agar enriquecido con gasolina 25 bacterias, agar nutritivo 11 individuos, 5 bacterias en agar GYEA y finalmente 1 bacteria en agar GYM.

La mayoría de las bacterias fueron de clasificadas como Gram Positivas (41), mesófilas (44), nitrotolerantes (41) y halófilas (46) lo que concuerdan con las características físico-químicas de los suelos.

Las características fisicoquímicas de los suelos juntos con las condiciones de aislamiento selectivo, influyeron en la recuperación de bacterias con características biodegradadoras, a partir del suelo arenoso y de los medios de cultivo suplementado con gasolina.

El dendrograma global de bacterias en base a los datos fenotípicos, de las 73 bacterias utilizadas en el estudio, permitió obtener 8 grupos especie de bacterias con un porcentaje de similaridad del 90%.

## **5.2 Recomendaciones**

Desarrollar un plan de crioconservación de todas las bacterias aisladas para prolongar su tiempo de vida útil y su utilización en el momento indicado.

Determinar la capacidad biodegradadora de hidrocarburos de las setenta y tres bacterias, en condiciones de microcosmos, para su posible utilización en biorremediación.

Ejecutar experimentos posteriores ajustando el pH del medio de aislamiento a 5, lo que probablemente permitiría aumentar el número de ufc/g de suelo arcilloso.

Realizar la identificación molecular de todos los representantes obtenidos en la presente investigación por taxonomía numérica para así establecer la ubicación taxonómica de las bacterias aisladas en la presente investigación.

## **CAPITULO VI**

### **PROPUESTA**

#### **6.1 Datos informativos**

##### **6.1.1 Título**

Establecimiento de un protocolo de aislamiento de bacterias con potencial para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos

##### **6.1.2 Instituciones ejecutoras**

Universidad Técnica de Ambato

##### **6.1.3 Beneficiarios**

Investigadores y Estudiantes Universitarios del Ecuador. Centros e instituciones de investigaciones microbiológicas y biotecnológicos. Empresas privadas relacionadas a la biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos.

##### **6.1.4 Ubicación**

UTA. Avenida los Chasquis y Río Payamino. Ciudadela Huachi chico. Ambato.

##### **6.1.5 Tiempo estimado para la ejecución**

Ocho meses

##### **6.1.6 Equipos técnico responsable**

Docentes, investigadores, estudiantes y tesisistas que se encuentren trabajando en aislamiento selectivo de microorganismos útiles en biotecnología.

#### **6.2 Antecedentes de la propuesta**

Las operaciones que realizan las industrias petroleras, exploración y producción conllevan a la generación de desechos orgánicos, así también a la contaminación de los suelos por derrames de petróleo. Para contrarrestar la contaminación se utiliza la técnica de biorremediación y por ende la capacidad de los microorganismos para biodegradar material contaminante. Los microorganismos con capacidad de degradar los hidrocarburos están presentes de manera

natural en el suelo, con su respectiva actividad metabólica para la utilización de los componentes del petróleo como fuente de energía. La investigación “Determinación de la biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para uso potencial en biorremediación” demostró la gran variedad de bacterias, las cuales al ser sometidas a pruebas fenotípicas y posteriormente taxonomía numérica permitió identificar microorganismos similares y diferentes, finalmente realizando pruebas bioquímicas y fisiológicas se determinó que los microorganismos son capaces de crecer en medios de cultivos enriquecidos con hidrocarburos, lo que demuestra que poseen actividad biodegradadora.

### **6.3 Justificación**

El estudio “Determinación de la biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para uso potencial en biorremediación”, demostró la gran variedad de microorganismos presentes en los suelos contaminados con petróleo. Las bacterias obtenidas en esta investigación servirán para establecer un protocolo de aislamiento utilizando hidrocarburos como el petróleo, gasolina y diesel. La aplicación de esta técnica a gran escala permitirá descontaminar ambientes que se encuentran contaminados con petróleo y sus derivados, obteniendo como resultado final una reducción de los contaminantes o subproductos menos nocivos para el medio ambiente y la salud humana.

### **6.4 Objetivos**

#### **6.4.1 General**

- Establecer un protocolo de aislamiento de bacterias con potencial para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

#### **6.4.2 Específicos**

- Determinar la población de bacterias presentes en suelos contaminados con derivados de petróleo
- Aislar selectivamente bacterias procedentes de suelos contaminados con potencial para la biorremediación.
- Caracterizar fenotípicamente las bacterias aisladas.
- Determinar la diversidad biológica de las bacterias obtenidas.

## 6.5 Análisis de factibilidad

La viabilidad de la propuesta “Establecimiento de un protocolo de aislamiento de bacterias con potencial para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos” se asegura con los resultados obtenidos en la investigación “Determinación de la biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para uso potencial en biorremediación”. Por ende el cumplimiento de los objetivos específicos dará como resultado el cumplimiento del objetivo general.

Además, los resultados de la investigación en la cual se fundamenta la presente propuesta, permitirán que los resultados finales sean obtenidos sin ninguna clase de inconveniente.

## 6.6 Fundamentación

La investigación “Determinación de la biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para uso potencial en biorremediación”, es la base científica para la formulación de la siguiente propuesta.

## 6.7 Metodología – Modelo Operativo

### 6.7.1 Caracterización físico-química de los suelos

Para la determinación de la humedad se pesarán previamente las cápsulas de porcelana y luego se procede a colocar en éstas 5 gramos de suelo de cada una de las muestras (Peso 1). Estas serán llevadas a la estufa a 105° C por 24 horas. Al retirar las muestras se dejarán enfriar y se pesarán nuevamente (Peso 2).

$$\% \text{ humedad} = \frac{\text{Peso 1} - \text{Peso 2}}{\text{Peso 2}} \times 100$$

Para la determinación de materia orgánica, las muestras procedentes de la estufa (Peso 1) se colocarán en una mufla, a 400° C por 24 horas. Al término de este tiempo se dejar enfriar y finalmente se obtiene el peso final (Peso 2).

El porcentaje de materia orgánica será determinado mediante la siguiente fórmula:



$$\% m. o = \frac{\text{Peso 1} - \text{Peso 2}}{\text{Peso 2}} \times 100$$

En la determinación de la conductividad se tomarán 5 gramos de muestra de suelo, se colocarán en vasos de precipitación con 50ml de agua destilada. Finalmente serán tomadas las mediciones respectivas de conductividad utilizando el conductímetro digital.

Para la determinación del pH de las muestras, se pesarán 10 gramos de suelo, los que serán colocados en un vaso de precipitación de 100 ml. Luego añadirán 25 ml de agua destilada, y se mezclarán con una cuchara por el lapso de 5 minutos. Las muestras serán dejaradas en reposo por una hora, y una vez transcurrido ese tiempo, se debe proceder a tomar las lecturas correspondientes de las muestras, con la ayuda de un pH-metro.

### **6.7.2 Determinación de la población y diversidad bacteriana**

Cada una de las muestras de suelo será usada para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFCs) y la diversidad de bacterias. Para ello se usará el método de difusión en placa y diluciones. Para preparar la dilución 1/10 se pesarán 10 gramos de suelo, los que se colocarán en una botella que contenga 90 ml de agua de llave estéril. La suspensión resultante será agitada por 1 hora. Una vez trascurrido éste tiempo se prepararán las diluciones 1/10<sup>2</sup>, 1/10<sup>3</sup>, 1/10<sup>4</sup>, 1/10<sup>5</sup>, 1/10<sup>6</sup> y 1/10<sup>7</sup>. Cien microlitros (100 µl) de las diluciones 1/10<sup>2</sup>, 1/10<sup>3</sup> y 1/10<sup>4</sup> serán colocados y extendidos por duplicado, sobre la superficie de cajas petri que contengan medio enriquecido con gasolina y petróleo, mientras que en agar nutritivo, las diluciones que serán colocadas son las de 1/10<sup>5</sup>, 1/10<sup>6</sup> y 1/10<sup>7</sup> y en GYM y GYEA serán colocadas diluciones 1/10<sup>1</sup>, 1/10<sup>2</sup>, 1/10<sup>3</sup>, todos suplementados con nistatin para evitar el crecimiento de hongos, a una concentración de 75 ug/ml, y ajustado su pH a 6.5. Las cajas inoculadas serán incubadas a 28°C por una semana. Luego de la incubación se procederá a contar el número de colonias presentes en cada una de las cajas. Además se anotará también el número de colonias diferentes.

El número de ufc por gramo de suelo será calculado para aquellas diluciones en las que el número de colonias se encuentre en un rango entre 30 hasta 300, usando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g suelo} = \frac{N \times FD \times Vt}{Vi \times S}$$

Donde:

**N**= Número de colonias

**FD**= Factor de dilución. Dilución en la cual se contó N (Ejemplo: Conteo realizado en la dilución  $1/10^3$ ,  $FD = 1 \times 10^3$ ).

**V<sub>t</sub>**= Volumen de la dilución 1/10, en mililitros

**V<sub>i</sub>**= Volumen inoculado, en mililitros

**S**= Cantidad de suelo utilizada para preparar la dilución 1/10

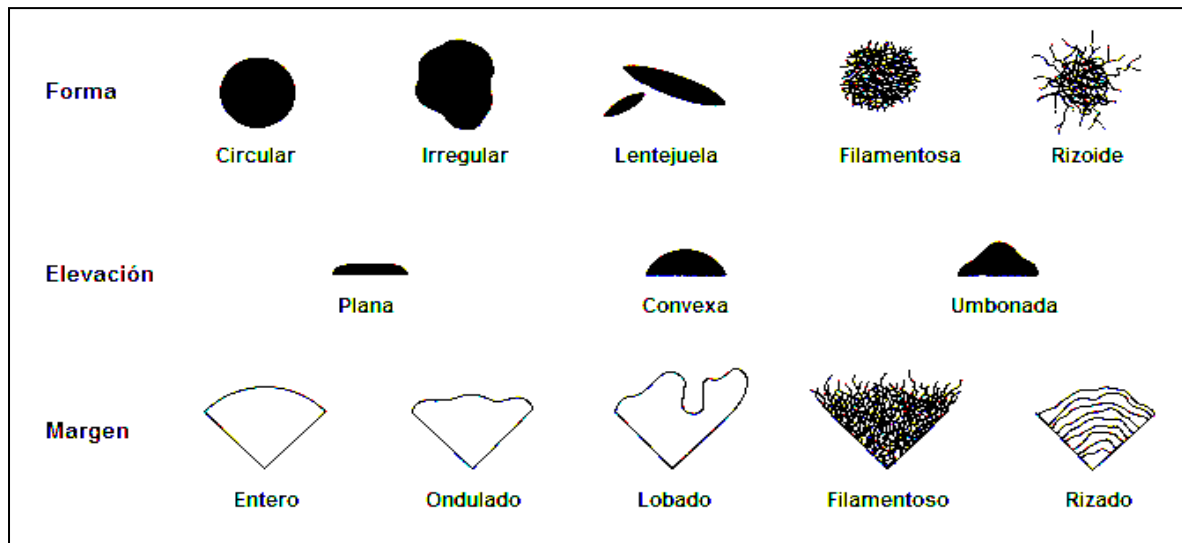
### **6.7.3 Aislamiento, purificación y almacenamiento de los microorganismos aislados**

Una vez comprobado el crecimiento de cada microorganismo se realizará un repique en cajas petri que contengan agar nutritivo, mediante estría compuesta. Los platos sembrados serán incubados a 28°C por 5 días. Aquellos que luego del período de incubación presenten características de cultivo puro, serán etiquetados y posteriormente almacenados en tubos plásticos que contengan 1 mililitro de glicerol al 20% (w/v) y almacenados a -10°C en un congelador, para su preservación a largo plazo. Al mismo tiempo se preparará un stock en tubos plásticos que contengan 700 microlitros de agua de llave estéril, y almacenados a 4°C en un refrigerador. Estos últimos serán usados para los diferentes experimentos a desarrollarse en el presente estudio. Aquellos que se encuentren contaminados, serán repicados las veces necesarias hasta obtener cultivo puro.

### **6.7.4 Caracterización macroscópica de los microorganismos**

Los cultivos puros obtenidos se agruparán de acuerdo a la coloración y morfología de las colonias. Para la determinación del color de la colonia se utilizará una tabla de colores. Las características generales serán descritas de acuerdo a las características de la Tabla 8.

**Tabla 8. Propuesta de la descripción morfológica de colonias bacterianas de acuerdo a la forma, elevación y margen.**



### 6.7.5 Caracterización microscópica de los microorganismos

Los microorganismos aislados serán usados para preparar muestras que serán observadas bajo el microscopio. Para las bacterias se determinará tinción de Gram, presencia de esporas y cápsulas.

#### 6.7.5.1 Tinción de Gram.

Se preparará un frotis, secado a temperatura ambiente, este se fijará sobre el mechero, se teñirá por 1 minuto con cristal violeta y luego se lavará con agua destilada, se cubrirá con una solución de Lugol durante 1 minuto y nuevamente se lavará con agua destilada y posteriormente con alcohol al 95%, se cubrirá con Safranina durante 20 segundos, posteriormente se lavará con agua destilada y finalmente el secado será a temperatura ambiente, luego cada una de las placas se observará al microscopio empezando con el lente de menor aumento.

#### 6.7.5.2 Tinción de endosporas.

El frotis se colocará sobre una rejilla ubicada sobre un recipiente con agua hirviendo. Todo el frotis se cubrirá con verde malaquita durante 10 minutos, añadiendo más colorante en caso de evaporación del mismo sobre la muestra. Luego se lavará con agua destilada para finalmente dar contraste con safranina durante 1 minuto. Para terminar, se lavará con agua destilada nuevamente y se secará a temperatura ambiente. La presencia de endosporas se determinará

usando el lente de inmersión. Las endosporas se teñirán de verde mientras que el resto de la célula presentará una coloración rojiza.

### **6.7.5.3 Tinción de cápsulas.**

El frotis será teñido con cristal violeta por 2 minutos para luego proceder a lavar el exceso de colorante con una solución de sulfato de cobre al 20% (p/v). La muestra se dejará secar a temperatura ambiente antes de proceder con la observación bajo el microscopio usando el lente de inmersión. La presencia de cápsula se determinará mediante la observación de una capa transparente rodeando la célula bacteriana teñida de púrpura

## **6.7.6 Caracterización bioquímica y fisiológica de los aislamientos**

### **6.7.6.1 Rango de crecimiento en función de la temperatura**

Se inocularán 3 µl de suspensiones de esporas previamente preparadas, sobre la superficie de agar nutritivo, medio enriquecido con gasolina y petróleo, para bacterias. Los platos inoculados serán incubados a una temperatura de 50°C, 37°C y 4°C durante 2, 4 y 5 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluarán las cajas para observar el crecimiento de bacterias, mediante código binario. Al actinomicete o bacteria que presente crecimiento, se le asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

### **6.7.6.2 Rango de crecimiento en función del pH**

Se inocularán 3 µl de las suspensiones de esporas en la superficie de agar nutritivo, agar enriquecido gasolina y petróleo para bacterias, respectivamente, ajustando a los pHs de 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5. El pH se ajustará con la ayuda de sistemas de búferes (Anexo C), para evitar los cambios en el pH debido al metabolismo de los microorganismos. Las cajas se incubarán a 28°C durante 7 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluarán las cajas para observar el crecimiento de bacterias, mediante código binario. A la bacteria que presente crecimiento, se asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

### **6.7.6.3 Rango de crecimiento en función de la salinidad**

Se inocularán 3 µl de las suspensiones de esporas en la superficie de agar nutritivo con las siguientes concentraciones de Cloruro de sodio (NaCl) al 1, 5 y 10% (w/v). Las cajas serán incubadas a 28°C durante 7 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluarán las cajas

para observar el crecimiento de las bacterias, mediante código binario. La bacteria que presente crecimiento, se asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

#### 6.7.6.4 Rango de crecimiento en función del hidrocarburo

Se inocularán 3 µl de suspensiones de esporas previamente preparadas, sobre la superficie de agar enriquecido con gasolina y petróleo para bacterias. Los platos inoculados serán incubados a una temperatura de 37°C durante 4 y 7 días respectivamente. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluarán las cajas para observar el crecimiento de las bacterias, mediante código binario. La bacteria que presente crecimiento, se asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

### 6.7 Administración

| INDICADORES A MEJORAR                                                       | SITUACIÓN ACTUAL                                                    | RESULTADOS ESPERADOS                                                                 | ACTIVIDADES                                                                                                | RESPONSABLES |
|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Planteamiento de una metodología para el aislamiento selectivo de bacterias | Sitios contaminados con petróleo, por su refinamiento y extracción. | Descontaminación de ambientes mediante el uso de bacterias aisladas del mismo sitio. | Caracterización macroscópica y microscópica de bacterias aisladas.                                         | Docente      |
|                                                                             | Carencia de bacterias nativas biorremediadoras en el Ecuador.       | Disminución de recursos económicos y saneamiento ambiental con bajo presupuesto.     | Pruebas fisiológicas y bioquímicas de las bacterias aisladas (pH, salinidad, temperatura e hidrocarburos). | Investigador |
|                                                                             |                                                                     |                                                                                      | Análisis de datos fenotípicos.                                                                             | Estudiante   |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

## 6.8 Previsión de la evaluación

| PREGUNTAS BÁSICAS           | EXPLICACIÓN                                                                                                                                                 |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ¿Quiénes solicitan evaluar? | Docente<br>Investigador                                                                                                                                     |
| ¿Por qué evaluar?           | Proporciona información acerca de la contaminación de los suelos con hidrocarburos y su posible descontaminación utilizando cepas aisladas del mismo sitio. |
| ¿Para qué evaluar?          | Para la determinación de la biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos.                                                     |
| ¿Qué evaluar?               | Datos obtenidos a partir de taxonomía numérica.                                                                                                             |
| ¿Quién evalúa?              | Docente                                                                                                                                                     |
| ¿Cuándo evaluar?            | Al finalizar las pruebas de taxonomía numérica.                                                                                                             |
| ¿Cómo evaluar?              | Realizando una matriz en código binario y analizando los datos obtenidos en todas las pruebas.                                                              |
| Con qué evaluar             | Programa NTSys y MSTATC (análisis estadístico).                                                                                                             |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

## **BIBLIOGRAFIA**

**ABALOS, Arelis; CAMACHO, Miladis; GOMEZ, José & PEREZ, Rosa.** 2008. Revista CENIC ciencias biológicas. Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. Volumen 39, No 1. Pag 45 y 46. [www.site.ebrary.com/lib/espesp/docDetail.action?docID=10280867&p00=aislamiento%20bacterias%20suelos%20contaminados](http://www.site.ebrary.com/lib/espesp/docDetail.action?docID=10280867&p00=aislamiento%20bacterias%20suelos%20contaminados).

**AMUSQUIVAR, Jorge; FLORES, Angélica; MOLLO, Ángel; MONTOYA, Carlos; SANCHEZ, Pamela.** 2002. Programa de Investigación Estratégica en Bolivia. Efectos ambientales y socioeconómicos por el derrame de petróleo en el río Desaguadero. Pág. 68 y 69.

**BAIRD, Colin.** 2001. Química ambiental. Editorial Reverté. Segunda edición. Pag. 561.

**BARNES, David; FILLER, Dennis; SNAPE, Ian.** 2008. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in cold regions. Cambridge University. Pág. 81 y 82.

**BEDOYA, Victoria; BOTERO, David; LEIDERMAN, Eduardo; RESTREPO, Angela & ROBLEDO, Jaime.** 2003. Enfermedades Infecciosas. Ediciones fondo editorial CIB. Sexta edición. Pág. 382.

**BELLOSO, Claudio; CARRARIO, Javier.** Bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de suelos contaminados. 2000. Pag 2-4.

**BLASCO, Rafael; CABALLERO, Francisco; CASTILLO, Francisco; HUERTAS, María; MARTINEZ, Manuel; MORENO, Conrado; ROLDAN, María.** 2005. Biotecnología Ambiental. Ediciones Tebar. Pag. 366, 426, 429, 431.

**BORGUES, Sonia & MORENO, Ana.** 2004. Avances en la taxonomía de las lombrices de tierra. Editorial Complutense. Pag 3.

**BUSTELO, Francisco.** 1994. Historia económica: introducción a la historia económica mundial. Editorial Complutense. Madrid-España. Pág. 207.

**CANO, Zenón; CARABIAS, Julia; MEAVE, Jorge & VALVERDE, Teresa.** 2007. Ecología y medio ambiente. Universidad Autónoma de México. Primera edición. Editorial Pearson. Pág. 158.

**CASE, Christine; FUNKE, Berdell & TORTORA, Gerard.** 2007. Introducción a la microbiología. Editorial medica Panamericana. Novena edición. Pág. 33 y 60.

**CASTRO, Blanco; DE LA GARZA, Francisco; HEYER, Lorenzo; ORTIZ, Yessica; RIVERA, Patricio.** 2003. Aislamiento de microorganismos a partir de suelos contaminados con hidrocarburos. Unidad Academica Multidisciplinaria Agronomia y Ciencias, Laboratorio Ambients Universidad Autonoma de Tamaulipas Cd. Victoria Tamaulipas, Mexico. Pag 5. [http://www.uaemex.mx/Red\\_Ambientales/docs/memorias/Extenso/TA/EC/TAC-03.pdf](http://www.uaemex.mx/Red_Ambientales/docs/memorias/Extenso/TA/EC/TAC-03.pdf).

**CHAPELLE, Francis.** 2001. Ground-water microbiology and geochemistry. Segunda edición. Estados Unidos. Pág. 356-357.

Constitución de la República del Ecuador. 2008. Publicación oficial de la Asamblea Constituyente. Pags. 50, 178 y 181.

**DOMÈNECH, Xavier & PERAL, José.** 2006. Química ambiental en sistemas terrestres. Editorial Reverte. España. Pág. 203

**FERNANDEZ, María; GARCÍA, Pedro; PAREDES, Fernando.** s/f. Microbiología Clínica Práctica. Segunda edición. Pag 31.

**FIGUEROA, Emilio.** 2006. El comportamiento económico del mercado del petróleo. Primera edición. Pág. 213.

**FIGUEROA, Eugenio.** 2005. Universidad de Chile. Programa Interdisciplinario de Estudios en Biodiversidad. Biodiversidad marina: valoración, usos y perspectivas: hacia dónde va Chile. Editorial Universitaria. Primera edición. Pág. 360.

**FONTAINE, Guillaume.** 2004. Petróleo y desarrollo sostenible en Ecuador: Las apuestas. FLACSO (Organization). Sede Ecuador. Primera edición. Pag. 67-70, 132.

Fundación Hogar del Empleado. 2003. Ecología Política. Editorial Ecaria.

**GAMBOA, María; GARCÍA, Jorge; HERNANDEZ, Francisco, RODRIGUEZ, Evelyn.** 2005. Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica. Pág.153.



**GARCÍA, Vera.** s/f. Introducción a la microbiología. Editorial Universidad Estatal a Distancia. Segunda edición. Pág. 59.

**GARY, James; HANDWERK, Glenn.** 1980. Refino de petróleo: tecnología y economía. Editorial Reverté. Pag. 22.

**GOMÉZ, Domingo.** 2004. Recuperación de espacios degradados. Ediciones Mundi-Prensa. Pag. 228.

**GUZMÁN, Marta.** 2007. La contaminación de suelos y aguas: Su prevención con nuevas sustancias naturales. Ediciones Universidad de Sevilla. Pag. 48.

**HERNÁNDEZ, Augusto; MARTÍNEZ, José.** 2001. Aislamiento y caracterización de bacterias del genero vibrio de aguas contaminadas por hidrocarburos. Red de revistas de américa latina, el Caribe, España y Portugal. Volumen 3. “. Xalapa-mexico”.

Instituto de Epidemiología y Salud Comunitaria "Manuel Amunárriz. Informe Yana Curi: impacto de la actividad petrolera en la salud de poblaciones Rurales de la amazonia Ecuatoriana. Edicione CICAME. 2000. Pag. 17-18.

**JUAREZ, Antonio & PARÉS, RAMÓN.** 2002. Bioquímica de los microorganismos. Editorial Reverté. Pág. 216-217.

**LISCANO, Fernando.** 2005. Fundamentos moleculares en medicina. Universidad de la Sabana. Editorial Manual moderno. Pág. 39.

**MANAHAN, Stanley.** 2007. Introducción a la química ambiental. Editorial Reverté. Primera edición. Pág. 638-639.

**MÁRQUEZ, María del Carmen & RAMOS, Pedro.** 2002. Avances en calidad Ambiental. Ediciones Universidad de Salamanca. Primera edición. Pág. 161.

**MATTHEWS, Karl & MONTVILLE, Thomas.** 2005. Food Microbiology: an introduction. Segunda edición. Washington DC. Pág. 15.

**OCHOA, Marco & VELARDE, Delia.** 2009. Artículo Técnico: Valoración económica y social de los pasivos ambientales generados en los pozos de producción del Campo Auca, provincia de Orellana. Ibarra-Ecuador.

- ORTÍZ, Pablo & VAREA, Anamaría.** 1995. Marea negra en la Amazonía: conflictos socioambientales vinculados a la actividad petrolera en el Ecuador. Primera edición. Pág. 75-80.
- PEPDA.** 2006. Proyecto de Eliminación de Piscinas y Derrames del Distrito Amazónico. <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2203/1/T-ESPE-025285.pdf>
- PENA, Sergio.** 2003. Consecuencias éticas y jurídicas en la relación diversidad biológica y biotecnología. Tokio-Japon. Pág. 14. [http://www.reei.org/reei6/S.PNeira\(reei6\).pdf](http://www.reei.org/reei6/S.PNeira(reei6).pdf)
- PIMENTEL, Emilio; ORTIZ, Alda; BREÑA, Matilde.** 2006. Tópicos de Genética. Primera edición. Toluca-México. Pág. 197.
- PRATS, Guillermo.** 2006. Microbiología Clínica. Editorial médica Panamericana. Primera edición. Pág. 27.
- PUMAROLA, Agustín.** 1995. Editorial Masson. Segunda edición. Microbiología y parasitología médica. Pág. 102-104
- ROSELL, Juan.** 2007. ¿Y después del petróleo qué? Luces y sombras del furo energético mundial. Segunda edición. Editorial Deusto. Barcelona-España. Pág. 113.
- SEOÁNEZ, Mariano.** 2002. Tratado de la contaminación atmosférica: problemas, tratamiento y gestión. Ediciones Mundi-prensa. Pág. 199.
- SOUZA, Adelaide.** 2007. Setores da Indústria Química Orgânica. Editorial E-papers. Pág. 130.
- VELASCO, Juan Antonio & VOLKE, Tania.** 2004. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto nacional de Ecología. Primera edición. Pág. 29, 30, 37.
- VIZUETE, Abel.** "Determinación de la capacidad biodegradadora de hidrocarburos de bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo". 2011. Trabajo de graduación, modalidad TEMI. Universidad Técnica de Ambato. Ambato-Ecuador.

**ANEXO A**

**DATOS EXPERIMENTALES**

**Tabla A1. Características fisicoquímicas de los suelos**

| Parámetros                      | Suelo Arenoso (TGA) | Suelo Arcilloso (TGL) |
|---------------------------------|---------------------|-----------------------|
| pH                              | 6.37                | 4.99                  |
| Conductividad ( $\mu\text{S}$ ) | 5190                | 127                   |
| % Humedad                       | 4.11                | 29.96                 |
| % Materia Orgánica              | 35.02               | 18.10                 |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla A2. Número de colonias de bacterias por diluciones y repeticiones para cada uno de los tratamientos en estudio.**

| Tratamientos | Factor A        | Factor B       | R1   | R2   | Dilución |
|--------------|-----------------|----------------|------|------|----------|
| <b>a0b0</b>  | Suelo Arenoso   | Agar nutritivo | 456  | 438  | 1,00E+7  |
| <b>a0b1</b>  | Suelo Arenoso   | Agar gasolina  | 1408 | 1480 | 1,00E+4  |
| <b>a0b2</b>  | Suelo Arenoso   | GYM            | 1424 | 1320 | 1,00E+3  |
| <b>a0b3</b>  | Suelo Arenoso   | GYEA           | 1580 | 1620 | 1,00E+3  |
| <b>a1b0</b>  | Suelo Arcilloso | Agar nutritivo | 251  | 239  | 1,00E+3  |
| <b>a1b1</b>  | Suelo Arcilloso | Agar gasolina  | 38   | 43   | 1,00E+2  |
| <b>a1b2</b>  | Suelo Arcilloso | GYM            | 12   | 9    | 1,00E+1  |
| <b>a1b3</b>  | Suelo Arcilloso | GYEA           | 5    | 3    | 1,00E+1  |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla A3. Número de colonias diferentes de bacterias**

| Tratamientos | Factor A        | Factor B       | R1 | R2 | Dilución |
|--------------|-----------------|----------------|----|----|----------|
| <b>a0b0</b>  | Suelo Arenoso   | Agar nutritivo | 7  | 5  | 1,00E+7  |
| <b>a0b1</b>  | Suelo Arenoso   | Agar gasolina  | 10 | 12 | 1,00E+4  |
| <b>a0b2</b>  | Suelo Arenoso   | GYM            | 4  | 6  | 1,00E+3  |
| <b>a0b3</b>  | Suelo Arenoso   | GYEA           | 3  | 4  | 1,00E+3  |
| <b>a1b0</b>  | Suelo Arcilloso | Agar nutritivo | 15 | 13 | 1,00E+3  |
| <b>a1b1</b>  | Suelo Arcilloso | Agar gasolina  | 5  | 4  | 1,00E+2  |
| <b>a1b2</b>  | Suelo Arcilloso | GYM            | 3  | 2  | 1,00E+1  |
| <b>a1b3</b>  | Suelo Arcilloso | GYEA           | 5  | 6  | 1,00E+1  |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla A4. Número de ufc/g suelo seco de bacterias**

| Tratamientos | Factor A        | Factor B       | R1       | R2       | R1 (log10) | R2 (log10) |
|--------------|-----------------|----------------|----------|----------|------------|------------|
| <b>a0b0</b>  | Suelo Arenoso   | Agar nutritivo | 4,28E+11 | 4,11E+11 | 11.631     | 11.614     |
| <b>a0b1</b>  | Suelo Arenoso   | Agar gasolina  | 1,32E+09 | 1,39E+09 | 9.121      | 9.143      |
| <b>a0b2</b>  | Suelo Arenoso   | GYM            | 1,34E+08 | 1,24E+08 | 8.127      | 8.093      |
| <b>a0b3</b>  | Suelo Arenoso   | GYEA           | 1,48E+08 | 1,52E+08 | 8.170      | 8.182      |
| <b>a1b0</b>  | Suelo Arcilloso | Agar nutritivo | 3,23E+07 | 3,07E+07 | 7.509      | 7.487      |
| <b>a1b1</b>  | Suelo Arcilloso | Agar gasolina  | 4,88E+05 | 5,53E+05 | 5.688      | 5.743      |
| <b>a1b2</b>  | Suelo Arcilloso | GYM            | 6,42E+03 | 3,85E+03 | 3.808      | 3.585      |
| <b>a1b3</b>  | Suelo Arcilloso | GYEA           | 1,54E+04 | 1,16E+04 | 4.188      | 4.064      |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla A5. Codificación de bacterias aisladas del suelo Arenoso**

| <b>Código TG</b> | <b>Medio</b> | <b>Dilución</b>   |
|------------------|--------------|-------------------|
| 002              | A.N          | 1/10 <sup>6</sup> |
| 004              | A.N          | 1/10 <sup>7</sup> |
| 005              | A.N          | 1/10 <sup>6</sup> |
| 006              | A.N          | 1/10 <sup>7</sup> |
| 007              | A.N          | 1/10 <sup>7</sup> |
| 008              | A.N          | 1/10 <sup>7</sup> |
| 014              | A.G          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 015              | A.G          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 016              | A.G          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 017              | A.G          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 018              | A.G          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 020              | A.G          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 021              | A.G          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 022              | A.G          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 023              | A.G          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 024              | A.G          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 025              | A.G          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 026              | A.G          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 027              | A.G          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 031              | A.G          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 046              | A.P          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 047              | A.P          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 050              | A.P          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 051              | A.P          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 052              | A.P          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 053              | A.P          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 054              | A.P          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 060              | A.P          | 1/10 <sup>5</sup> |
| 061              | A.P          | 1/10 <sup>5</sup> |
| 062              | A.P          | 1/10 <sup>5</sup> |
| 063              | A.P          | 1/10 <sup>5</sup> |
| 064              | A.P          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 065              | A.P          | 1/10 <sup>5</sup> |
| 066              | A.P          | 1/10 <sup>5</sup> |
| 067              | A.P          | 1/10 <sup>4</sup> |
| 069              | A.P          | 1/10 <sup>5</sup> |
| 070              | A.P          | 1/10 <sup>5</sup> |
| 071              | A.P          | 1/10 <sup>5</sup> |
| 080              | GYM          | 1/10 <sup>3</sup> |

**Tabla A5. Continuación...**

| <b>Código</b> | <b>Medio</b> | <b>Dilución</b>   |
|---------------|--------------|-------------------|
| 072           | GYEA         | 1/10 <sup>5</sup> |
| 073           | GYEA         | 1/10 <sup>3</sup> |
| 082           | GYEA         | 1/10 <sup>4</sup> |
| 083           | GYEA         | 1/10 <sup>3</sup> |
| 084           | GYEA         | 1/10 <sup>3</sup> |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla A6. Codificación de bacterias aisladas del suelo Arcilloso**

| <b>Código</b> | <b>Medio</b> | <b>Dilución</b>    |
|---------------|--------------|--------------------|
| 085           | A.N          | 1/10 <sup>2</sup>  |
| 087           | A.N          | 1/10 <sup>2</sup>  |
| 088           | A.N          | 1/10 <sup>2</sup>  |
| 089           | A.N          | 1/10 <sup>3</sup>  |
| 091           | A.N          | 1/10 <sup>4</sup>  |
| 092           | A.G          | 1/10 <sup>4</sup>  |
| 093           | A.G          | 1/10 <sup>4</sup>  |
| 095           | A.G          | 1/10 <sup>3</sup>  |
| 097           | A.G          | 1/10 <sup>3</sup>  |
| 103           | A.G          | 1/10 <sup>3</sup>  |
| 104           | A.G          | 1/10 <sup>3</sup>  |
| 105           | A.G          | 1/10 <sup>3</sup>  |
| 106           | A.G          | 1/10 <sup>3</sup>  |
| 107           | A.G          | 1/10 <sup>3</sup>  |
| 108           | A.G          | 1/10 <sup>3</sup>  |
| 110           | A.G          | 1/10 <sup>3</sup>  |
| 112           | A.P          | 1/10 <sup>2</sup>  |
| 113           | A.P          | 1/10 <sup>2</sup>  |
| 114           | A.P          | 1/10 <sup>2</sup>  |
| 117           | A.P          | 1/110 <sup>3</sup> |
| 118           | A.P          | 1/10 <sup>2</sup>  |
| 119           | A.P          | 1/10 <sup>2</sup>  |
| 120           | A.P          | 1/10 <sup>2</sup>  |
| 122           | A.P          | 1/10 <sup>2</sup>  |
| 123           | A.P          | 1/10 <sup>2</sup>  |
| 125           | A.P          | 1/10 <sup>2</sup>  |
| 126           | A.P          | 1/10 <sup>3</sup>  |
| 130           | A.P          | 1/10 <sup>2</sup>  |
| 131           | A.P          | 1/10 <sup>3</sup>  |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla A7. Grupos de color formados por las bacterias aisladas de los suelos contaminados**

| <b>Grupos</b> | <b>Color</b>           | <b>Miembros</b> |
|---------------|------------------------|-----------------|
| 1             | Lavanda                | 004             |
|               |                        | 006             |
|               |                        | 005             |
|               |                        | 085             |
| 2             | Amarillo               | 061             |
|               |                        | 062             |
| 3             | Amarillo limón         | 016             |
|               |                        | 073             |
| 4             | Amarillo canario       | 082             |
|               |                        | 083             |
|               |                        | 084             |
| 5             | Verde manzana          | 014             |
|               |                        | 015             |
|               |                        | 046             |
| 6             | Amarillo oro           | 024             |
|               |                        | 025             |
|               |                        | 026             |
|               |                        | 027             |
|               |                        | 092             |
| 7             | Amarillo canario claro | 089             |
|               |                        | 119             |
|               |                        | 120             |
| 8             | Salmón                 | 063             |
|               |                        | 064             |
|               |                        | 065             |
|               |                        | 066             |
|               |                        | 080             |
| 9             | Melocotón claro        | 091             |
|               |                        | 112             |
| 10            | Traslucido melocotón   | 122             |
|               |                        | 125             |
| 11            | Incoloro crema         | 107             |
|               |                        | 108             |
|               |                        | 110             |
| 12            | Traslucido             | 104             |
|               |                        | 105             |
|               |                        | 106             |



Tabla A7. Continuación...

| Grupos | Color                        | Miembros |
|--------|------------------------------|----------|
| 13     | Traslucido blanco            | 117      |
|        |                              | 118      |
| 14     | Traslucido crema             | 130      |
|        |                              | 131      |
| 15     | Mandarina                    | 069      |
|        |                              | 070      |
|        |                              | 071      |
| 16     | Amarillo claro               | 050      |
| 17     | Marfil claro                 | 088      |
| 18     | Beige claro                  | 114      |
| 19     | Coral                        | 002      |
| 20     | Rosa                         | 020      |
| 21     | Mandarina claro              | 021      |
| 22     | Amarillo cadmio              | 023      |
| 23     | Blanco                       | 031      |
| 24     | Coral translucido            | 060      |
| 25     | Marfil                       | 093      |
| 26     | Cristal                      | 095      |
| 27     | Traslucido rosate            | 123      |
| 28     | Ocre oro                     | 022      |
| 29     | Amarillo limón claro         | 053      |
| 30     | Naranja                      | 054      |
| 31     | Crema translúcido claro      | 007      |
| 32     | Beige                        | 047      |
| 33     | Beige translucido            | 051      |
| 34     | Amarillo piel                | 018      |
| 35     | Amarillo canario translucido | 017      |
| 36     | Traslucido amarillo          | 008      |
| 37     | Salmon claro                 | 067      |
| 38     | Amarillo cadmio translucido  | 072      |
| 39     | Amarillo cadmio claro        | 113      |
| 40     | Coral claro                  | 052      |
| 41     | Incoloro                     | 126      |
| 42     | Melocotón                    | 103      |
| 43     | Marfil translucido           | 097      |
| 44     | Plata                        | 087      |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla A8. Descripción morfológica de las colonias bacterianas de acuerdo a la forma, elevación y margen.**

| <b>Grupos</b> | <b>Miembros</b>                 | <b>Forma</b> | <b>Elevación</b> | <b>Margen</b> |
|---------------|---------------------------------|--------------|------------------|---------------|
| 1             | 004<br>006<br>005<br>085        | Circular     | Plana            | Entero        |
| 2             | 061<br>062                      | Irregular    | Plana            | Ondulado      |
| 3             | 016<br>073                      | Circular     | Plana            | Entero        |
| 4             | 082<br>083<br>084               | Circular     | Plana            | Entero        |
| 5             | 014<br>015<br>046               | Irregular    | Plana            | Ondulado      |
| 6             | 024<br>025<br>026<br>027<br>092 | Circular     | Plana            | Entero        |
| 7             | 089<br>119<br>120               | Irregular    | Plana            | Ondulado      |
| 8             | 063<br>064<br>065<br>066<br>080 | Circular     | Plana            | Entero        |
| 9             | 091<br>112                      | Irregular    | Plana            | Ondulado      |
| 10            | 122<br>125                      | Irregular    | Plana            | Ondulado      |
| 11            | 107<br>108<br>110               | Circular     | Plana            | Entero        |
| 12            | 104<br>105<br>106               | Irregular    | Convexa          | Ondulado      |

**Tabla A8. Continuación...**

|    |                   |           |         |          |
|----|-------------------|-----------|---------|----------|
| 13 | 117<br>118        | Circular  | Plana   | Entero   |
| 14 | 130<br>131        | Circular  | Plana   | Entero   |
| 15 | 069<br>070<br>071 | Circular  | Plana   | Entero   |
| 16 | 050               | Irregular | Plana   | Ondulado |
| 17 | 088               | Irregular | Plana   | Ondulado |
| 18 | 114               | Circular  | Plana   | Entero   |
| 19 | 002               | Irregular | Plana   | Ondulado |
| 20 | 020               | Circular  | Plana   | Entero   |
| 21 | 021               | Irregular | Plana   | Ondulado |
| 22 | 023               | Irregular | Plana   | Entero   |
| 23 | 031               | Circular  | Convexa | Entero   |
| 24 | 060               | Circular  | Plana   | Entero   |
| 25 | 093               | Circular  | Convexa | Ondulado |
| 26 | 095               | Circular  | Convexa | Entero   |
| 27 | 123               | Irregular | Convexa | Ondulado |
| 28 | 022               | Irregular | Plana   | Ondulado |
| 29 | 053               | Circular  | Convexa | Entero   |
| 30 | 054               | Circular  | Plana   | Entero   |
| 31 | 007               | Irregular | Convexa | Ondulado |
| 32 | 047               | Irregular | Convexa | Ondulado |
| 33 | 051               | Circular  | Convexa | Entero   |
| 34 | 018               | Circular  | Plana   | Entero   |
| 35 | 017               | Circular  | Convexa | Entero   |
| 36 | 008               | Irregular | Plana   | Ondulado |
| 37 | 067               | Circular  | Plana   | Entero   |
| 38 | 072               | Circular  | Plana   | Ondulado |
| 39 | 113               | Circular  | Plana   | Entero   |
| 40 | 052               | Circular  | Plana   | Entero   |
| 41 | 126               | Irregular | Plana   | Ondulado |
| 42 | 103               | Circular  | Plana   | Entero   |
| 43 | 097               | Irregular | Convexa | Ondulado |
| 44 | 087               | Circular  | Convexa | Entero   |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla A9. Tinción general de Gram, cápsulas, endosporas y forma de las bacterias aisladas**

| <b>Código TG</b> | <b>Tinción GRAM</b> | <b>Forma</b> | <b>Tinción cápsulas</b> | <b>Tinción endosporas</b> |
|------------------|---------------------|--------------|-------------------------|---------------------------|
| 002              | -                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 004              | -                   | Bacilos      | +                       | -                         |
| 005              | -                   | Bacilos      | +                       | -                         |
| 006              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 007              | -                   | Bacilos      | +                       | -                         |
| 008              | -                   | Bacilos      | +                       | -                         |
| 014              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 015              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 016              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 017              | -                   | Cocos        | -                       | -                         |
| 018              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 020              | +                   | Cocos        | -                       | -                         |
| 021              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 022              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 023              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 024              | +                   | Cocos        | -                       | -                         |
| 025              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 026              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 027              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 031              | -                   | Cocos        | -                       | -                         |
| 046              | +                   | Cocos        | -                       | -                         |
| 047              | -                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 050              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 051              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 052              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 053              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 054              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 060              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 061              | -                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 062              | -                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 063              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 064              | -                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 065              | -                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 066              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 067              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 069              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |
| 070              | +                   | Bacilos      | +                       | -                         |
| 071              | +                   | Bacilos      | +                       | -                         |
| 080              | +                   | Cocos        | +                       | -                         |

Tabla A9. Continuación...

| Código TG | Tinción GRAM | Forma   | Tinción cápsulas | Tinción endosporas |
|-----------|--------------|---------|------------------|--------------------|
| 072       | -            | Cocos   | +                | -                  |
| 073       | +            | Cocos   | +                | -                  |
| 082       | +            | Cocos   | +                | -                  |
| 083       | +            | Cocos   | +                | -                  |
| 084       | +            | Cocos   | +                | -                  |
| 085       | +            | Cocos   | +                | -                  |
| 087       | -            | Cocos   | +                | -                  |
| 088       | -            | Bacilos | -                | -                  |
| 089       | -            | Bacilos | +                | -                  |
| 091       | +            | Cocos   | +                | -                  |
| 092       | +            | Cocos   | +                | -                  |
| 093       | +            | Cocos   | +                | -                  |
| 095       | n.d          | Bacilos | -                | -                  |
| 097       | +            | Cocos   | +                | -                  |
| 103       | -            | Bacilos | +                | -                  |
| 104       | -            | Bacilos | +                | -                  |
| 105       | -            | Bacilos | +                | -                  |
| 106       | -            | Bacilos | +                | -                  |
| 107       | -            | Bacilos | +                | -                  |
| 108       | -            | Cocos   | +                | -                  |
| 110       | -            | Cocos   | +                | -                  |
| 112       | +            | Cocos   | +                | -                  |
| 113       | +            | Cocos   | +                | -                  |
| 114       | +            | Cocos   | +                | -                  |
| 117       | -            | Cocos   | +                | -                  |
| 118       | -            | Bacilos | +                | -                  |
| 119       | -            | Bacilos | +                | -                  |
| 120       | -            | Bacilos | +                | -                  |
| 122       | +            | Bacilos | -                | +                  |
| 123       | -            | Bacilos | +                | -                  |
| 125       | +            | Cocos   | +                | -                  |
| 126       | -            | Cocos   | +                | -                  |
| 130       | -            | Bacilos | +                | -                  |
| 131       | -            | Bacilos | +                | -                  |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla A10. Número de bacterias que presentaron forma de cocos o bacilos según el tipo de suelo que fueron aisladas.**

| <b>Tipo de suelo</b> | <b>Cocos</b> | <b>Bacilos</b> |
|----------------------|--------------|----------------|
| <b>Arenoso</b>       | 38           | 6              |
| <b>Arcilloso</b>     | 14           | 15             |

Elaborado por: Tatiana Gaviláñez, 2012.

**Tabla A11. Número de bacterias que presentaron forma de cocos o bacilos según el medio de cultivo utilizado para su aislamiento.**

| <b>Medio de cultivo</b> | <b>Cocos</b> | <b>Bacilos</b> |
|-------------------------|--------------|----------------|
| <b>Agar Nutritivo</b>   | 5            | 6              |
| <b>Agar Gasolina</b>    | 19           | 6              |
| <b>Agar Petróleo</b>    | 22           | 9              |
| <b>GYM</b>              | 1            | 0              |
| <b>GYEA</b>             | 5            | 0              |

Elaborado por: Tatiana Gaviláñez, 2012.

**Tabla A12. Número de bacterias que presentaron Tinción de Gram positiva o negativa, cápsulas, endosporas según el tipo de suelo que fueron aisladas.**

| <b>Tipo de suelo</b> | <b>Gram +</b> | <b>Gram -</b> | <b>Gram n.d</b> | <b>Cápsulas +</b> | <b>Endosporas +</b> |
|----------------------|---------------|---------------|-----------------|-------------------|---------------------|
| <b>Arenoso</b>       | 31            | 13            | 0               | 39                | 0                   |
| <b>Arcilloso</b>     | 10            | 18            | 1               | 26                | 1                   |

Elaborado por: Tatiana Gaviláñez, 2012

**Tabla A13. Número de bacterias que presentaron Tinción de Gram positiva o negativa, cápsulas, endosporas según el tipo medio utilizado para los aislamientos.**

| Medio de cultivo | Gram + | Gram - | Gram n.d | Cápsulas + | Endosporas + |
|------------------|--------|--------|----------|------------|--------------|
| Agar Nutritivo   | 3      | 8      | 0        | 10         | 0            |
| Agar Gasolina    | 15     | 9      | 1        | 20         | 1            |
| Agar Petróleo    | 18     | 13     | 0        | 29         | 0            |
| GYM              | 1      | 0      | 0        | 1          | 0            |
| GYEA             | 4      | 1      | 0        | 5          | 0            |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012

**Tabla A14. Rango de crecimiento de todas las bacterias en función de la temperatura**

| Código TG | 4°C | 28°C | 37°C | 50°C | Clasificación |
|-----------|-----|------|------|------|---------------|
| 002       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 004       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 005       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 006       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 007       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 008       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 014       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 015       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 016       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 017       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 018       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 020       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 021       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 022       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 023       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 024       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 025       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 026       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 027       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |

Tabla A14. Continuación...

| Código TG | 4°C | 28°C | 37°C | 50°C | Clasificación |
|-----------|-----|------|------|------|---------------|
| 031       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 046       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 047       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 050       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 051       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 052       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 053       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 054       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 060       | 0   | 1    | 0    | 0    | Mesófilo      |
| 061       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 062       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 063       | 1   | 1    | 1    | 1    | Termófilo     |
| 064       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 065       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 066       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 067       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 069       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 070       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 071       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 080       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 072       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 073       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 082       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 083       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 084       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 085       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 087       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 088       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 089       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |
| 091       | 0   | 1    | 0    | 0    | Mesófilo      |
| 092       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 093       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 095       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 097       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 103       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 104       | 0   | 1    | 0    | 0    | Mesófilo      |
| 105       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 106       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 107       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 108       | 0   | 1    | 1    | 0    | Mesófilo      |
| 110       | 1   | 1    | 1    | 0    | Psicrótrofo   |



**Tabla A14. Continuación...**

| <b>Código TG</b> | <b>4°C</b> | <b>28°C</b> | <b>37°C</b> | <b>50°C</b> | <b>Clasificación</b> |
|------------------|------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|
| 112              | 0          | 1           | 1           | 0           | Mesófilo             |
| 114              | 0          | 1           | 1           | 0           | Mesófilo             |
| 117              | 0          | 1           | 0           | 0           | Mesófilo             |
| 118              | 0          | 1           | 0           | 0           | Mesófilo             |
| 119              | 0          | 1           | 1           | 0           | Mesófilo             |
| 120              | 0          | 1           | 1           | 0           | Mesófilo             |
| 122              | 0          | 1           | 1           | 1           | Termófilo            |
| 123              | 0          | 1           | 0           | 0           | Mesófilo             |
| 125              | 1          | 1           | 1           | 0           | Psicrótrofo          |
| 126              | 0          | 1           | 1           | 0           | Mesófilo             |
| 130              | 0          | 1           | 1           | 0           | Mesófilo             |
| 131              | 0          | 1           | 0           | 0           | Mesófilo             |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla A15. Clasificación de las bacterias según la Temperatura a partir de los tipos de suelos utilizados para el aislamiento.**

| <b>Pruebas</b> | <b>Clasificación</b> | <b>Suelo Arenoso</b> | <b>Suelo Arcilloso</b> |
|----------------|----------------------|----------------------|------------------------|
|                | Psicrótrofos         | 23                   | 4                      |
| Temperatura    | Mesófilos            | 20                   | 24                     |
|                | Termófilos           | 1                    | 1                      |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla A16. Clasificación de las bacterias según la Temperatura de acuerdo a los medios de cultivo utilizados para el aislamiento.**

| <b>Pruebas</b> | <b>Clasificación</b> | <b>Agar nutritivo</b> | <b>Agar Gasolina</b> | <b>Agar Petróleo</b> | <b>GYM</b> | <b>GYEA</b> |
|----------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|------------|-------------|
|                | Psicrótrofos         | 7                     | 8                    | 9                    | 0          | 3           |
| Temperatura    | Mesófilos            | 4                     | 17                   | 20                   | 1          | 2           |
|                | Termófilos           | 0                     | 0                    | 2                    | 0          | 0           |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012

**Tabla A17. Rango de crecimiento de las bacterias aisladas en función del pH**

| <b>Código TG</b> | <b>4.5</b> | <b>5.5</b> | <b>6.5</b> | <b>7.5</b> | <b>8.5</b> | <b>Clasificación</b> |
|------------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------------------|
| 002              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 004              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 005              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 006              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 007              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 008              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 014              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 015              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 016              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 017              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 018              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 020              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 021              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 022              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 023              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 024              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 025              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 026              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 027              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 031              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 046              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 047              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 050              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 051              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 052              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 053              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 054              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 060              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 061              | 0          | 0          | 1          | 0          | 0          | Neutrotolerante      |
| 062              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 063              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 064              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 065              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 066              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 067              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 069              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |

Tabla A17. Continuación...

| <b>Código TG</b> | <b>4.5</b> | <b>5.5</b> | <b>6.5</b> | <b>7.5</b> | <b>8.5</b> | <b>Clasificación</b> |
|------------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------------------|
| 070              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 071              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 080              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 072              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 073              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 082              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 083              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 084              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 085              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 087              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 088              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 089              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 091              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 092              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 093              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 095              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 097              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 103              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 104              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 105              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 106              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 107              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 108              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 110              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 112              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 113              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 114              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 117              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 118              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 119              | 0          | 1          | 1          | 0          | 0          | Acidófilo            |
| 120              | 1          | 1          | 1          | 0          | 0          | Acidófilo            |
| 122              | 0          | 1          | 1          | 1          | 0          | Neutrotolerante      |
| 123              | 0          | 0          | 1          | 0          | 0          | Neutrotolerante      |
| 125              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 126              | 0          | 0          | 1          | 1          | 0          | Neutrofilo           |
| 130              | 0          | 0          | 1          | 0          | 0          | Neutrotolerante      |
| 131              | 0          | 0          | 1          | 0          | 0          | Neutrotolerante      |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla A18. Clasificación de las bacterias según el pH a partir de los tipos de suelos utilizados para el aislamiento.**

| Pruebas | Clasificación    | Suelo Arenoso | Suelo Arcilloso |
|---------|------------------|---------------|-----------------|
| pH      | Neutrófilos      | 14            | 16              |
|         | Neutrotolerantes | 30            | 11              |
|         | Acidófilos       | 0             | 2               |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla A19. Clasificación de las bacterias según el pH de acuerdo a los medios de cultivo utilizados para el aislamiento.**

| Pruebas | Clasificación    | Agar nutritivo | Agar Gasolina | Agar Petróleo | GYM | GYEA |
|---------|------------------|----------------|---------------|---------------|-----|------|
| pH      | Neutrófilos      | 4              | 14            | 12            | 0   | 0    |
|         | Neutrotolerantes | 7              | 11            | 17            | 1   | 5    |
|         | Acidófilos       | 0              | 0             | 2             | 0   | 0    |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla A20. Rango de crecimiento en función de la salinidad (NaCl)**

| Código TG | 1% | 5% | 10% | Clasificación    |
|-----------|----|----|-----|------------------|
| 002       | 1  | 1  | 1   | Halófilo extremo |
| 004       | 1  | 1  | 0   | Halófilo         |
| 005       | 1  | 1  | 0   | Halófilo         |
| 006       | 1  | 1  | 0   | Halófilo         |
| 007       | 1  | 1  | 0   | Halófilo         |
| 008       | 1  | 0  | 0   | Halófilo débil   |
| 014       | 1  | 1  | 0   | Halófilo         |
| 015       | 1  | 1  | 0   | Halófilo         |
| 016       | 1  | 1  | 0   | Halófilo         |
| 017       | 1  | 1  | 0   | Halófilo         |
| 018       | 1  | 1  | 0   | Halófilo         |

Tabla A20. Continuación...

| <b>Código TG</b> | <b>1%</b> | <b>5%</b> | <b>10%</b> | <b>Clasificación</b> |
|------------------|-----------|-----------|------------|----------------------|
| 020              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 021              | 1         | 1         | 1          | Halófilo extremo     |
| 022              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 023              | 1         | 1         | 1          | Halófilo extremo     |
| 024              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 025              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 026              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 027              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 031              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 046              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 047              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 050              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 051              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 052              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 053              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 054              | 1         | 1         | 1          | Halófilo extremo     |
| 060              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 061              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 062              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 063              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 064              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 065              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 066              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 067              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 069              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 070              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 071              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 080              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 072              | 1         | 1         | 1          | Halófilo extremo     |
| 073              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 082              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 083              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 084              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 085              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 087              | 1         | 1         | 1          | Halófilo extremo     |
| 088              | 1         | 1         | 1          | Halófilo extremo     |
| 089              | 1         | 0         | 0          | Halófilo débil       |
| 091              | 1         | 0         | 0          | Halófilo débil       |
| 092              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 093              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 095              | 1         | 0         | 0          | Halófilo débil       |

**Tabla A20. Continuación...**

| <b>Código TG</b> | <b>1%</b> | <b>5%</b> | <b>10%</b> | <b>Clasificación</b> |
|------------------|-----------|-----------|------------|----------------------|
| 097              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 103              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 104              | 0         | 0         | 0          | No tolerante         |
| 105              | 1         | 0         | 0          | Halófilo débil       |
| 106              | 1         | 0         | 0          | Halófilo débil       |
| 107              | 1         | 0         | 0          | Halófilo débil       |
| 108              | 1         | 0         | 0          | Halófilo débil       |
| 110              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 112              | 0         | 0         | 0          | No tolerante         |
| 113              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 114              | 1         | 0         | 0          | Halófilo débil       |
| 117              | 1         | 0         | 0          | Halófilo débil       |
| 118              | 1         | 0         | 0          | Halófilo débil       |
| 119              | 1         | 0         | 0          | Halófilo débil       |
| 120              | 1         | 0         | 0          | Halófilo débil       |
| 122              | 1         | 1         | 1          | Halófilo extremo     |
| 123              | 1         | 1         | 0          | Halófilo             |
| 125              | 1         | 1         | 1          | Halófilo extremo     |
| 126              | 0         | 0         | 0          | No tolerante         |
| 130              | 1         | 0         | 0          | Halófilo débil       |
| 131              | 0         | 0         | 0          | No tolerante         |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla A21. Clasificación de las bacterias según la Salinidad a partir de los tipos de suelos utilizados para el aislamiento.**

| <b>Pruebas</b>   | <b>Clasificación</b> | <b>Suelo Arenoso</b> | <b>Suelo Arcilloso</b> |
|------------------|----------------------|----------------------|------------------------|
| Salinidad (NaCl) | Halófilo débil       | 1                    | 13                     |
|                  | Halófilo             | 38                   | 8                      |
|                  | Halófilo extremo     | 5                    | 4                      |
|                  | No tolerante         | 0                    | 4                      |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla A22. Clasificación de las bacterias según Salinidad de acuerdo a los medios de cultivo utilizados para el aislamiento.**

| Pruebas          | Clasificación    | Agar nutritivo | Agar Gasolina | Agar Petróleo | GYM | GYEA |
|------------------|------------------|----------------|---------------|---------------|-----|------|
| Salinidad (NaCl) | Halófilo débil   | 3              | 5             | 6             | 0   | 0    |
|                  | Halófilo         | 5              | 17            | 19            | 1   | 4    |
|                  | Halófilo extremo | 3              | 2             | 3             | 0   | 1    |
|                  | No tolerantes    | 0              | 1             | 3             | 0   | 0    |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla A23. Crecimiento en medio enriquecido con petróleo y gasolina**

| Código TG | Petróleo | Gasolina |
|-----------|----------|----------|
| 002       | 1        | 1        |
| 004       | 1        | 1        |
| 005       | 1        | 1        |
| 006       | 1        | 1        |
| 007       | 1        | 1        |
| 008       | 1        | 1        |
| 014       | 1        | 1        |
| 015       | 1        | 1        |
| 016       | 1        | 1        |
| 017       | 1        | 1        |
| 018       | 1        | 1        |
| 020       | 1        | 1        |
| 021       | 1        | 1        |
| 022       | 1        | 1        |
| 023       | 1        | 1        |
| 024       | 1        | 1        |
| 025       | 1        | 1        |
| 026       | 1        | 1        |
| 027       | 1        | 1        |
| 031       | 1        | 1        |
| 046       | 1        | 1        |
| 047       | 1        | 1        |
| 050       | 1        | 1        |

Tabla A23. Continuación...

| Código TG | Petróleo | Gasolina |
|-----------|----------|----------|
| 051       | 1        | 1        |
| 052       | 1        | 1        |
| 053       | 1        | 1        |
| 054       | 1        | 1        |
| 060       | 1        | 1        |
| 061       | 1        | 1        |
| 062       | 1        | 1        |
| 063       | 1        | 1        |
| 064       | 1        | 1        |
| 065       | 1        | 1        |
| 066       | 1        | 1        |
| 067       | 1        | 1        |
| 069       | 1        | 1        |
| 070       | 1        | 1        |
| 071       | 1        | 1        |
| 080       | 1        | 1        |
| 072       | 1        | 1        |
| 073       | 1        | 1        |
| 082       | 1        | 1        |
| 083       | 1        | 1        |
| 084       | 1        | 1        |
| 085       | 1        | 1        |
| 087       | 1        | 1        |
| 088       | 1        | 1        |
| 089       | 1        | 1        |
| 091       | 0        | 1        |
| 092       | 1        | 1        |
| 093       | 1        | 1        |
| 095       | 1        | 1        |
| 097       | 1        | 1        |
| 103       | 1        | 1        |
| 104       | 1        | 1        |
| 105       | 1        | 1        |
| 106       | 1        | 1        |
| 107       | 1        | 1        |
| 108       | 1        | 1        |
| 110       | 1        | 1        |
| 112       | 1        | 1        |
| 113       | 1        | 1        |
| 114       | 1        | 1        |
| 117       | 1        | 1        |



**Tabla A23. Continuación...**

| <b>Código</b> | <b>Petróleo</b> | <b>Gasolina</b> |
|---------------|-----------------|-----------------|
| 118           | 1               | 1               |
| 119           | 1               | 1               |
| 120           | 1               | 1               |
| 122           | 1               | 1               |
| 123           | 1               | 0               |
| 125           | 1               | 1               |
| 126           | 0               | 0               |
| 130           | 1               | 1               |
| 131           | 0               | 0               |

Elaborado por: Tatiana Gaviláñez, 2012.

**Tabla A24. Tolerancia de las bacterias a los hidrocarburos a partir de los tipos de suelos utilizados para el aislamiento.**

| <b>Pruebas</b> | <b>Clasificación</b> | <b>Suelo Arenoso</b> | <b>Suelo Arcilloso</b> |
|----------------|----------------------|----------------------|------------------------|
| Hidrocarburos  | Gasolina             | 0                    | 1                      |
|                | Petróleo             | 0                    | 1                      |
|                | No tolerante         | 0                    | 2                      |
|                | Gasolina y petróleo  | 44                   | 25                     |

Elaborado por: Tatiana Gaviláñez, 2012.

**Tabla A25. Tolerancia de las bacterias a los hidrocarburos de acuerdo a los medios de cultivo utilizados del que fueron aisladas.**

| <b>Pruebas</b> | <b>Clasificación</b> | <b>Agar nutritivo</b> | <b>Agar Gasolina</b> | <b>Agar Petróleo</b> | <b>GYM</b> | <b>GYEA</b> |
|----------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|------------|-------------|
| Hidrocarburos  | Gasolina             | 1                     | 0                    | 0                    | 0          | 0           |
|                | Petróleo             | 0                     | 0                    | 1                    | 0          | 0           |
|                | Gasolina y petróleo  | 10                    | 25                   | 28                   | 1          | 5           |
|                | No tolerantes        | 0                     | 0                    | 2                    | 0          | 0           |

Elaborado por: Tatiana Gaviláñez, 2012.

**Tabla A26. Taxonomía numérica de datos fenotípicos**

| <b>Grupo - especie</b> | <b>Miembros</b>                                                                                                                                                                                   |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Grupo 1</b>         | TG: 004, 006, 005, 070, 071, 103, 085, 067, 113, 016, 073, 024, 026, 025, 027, 092, 082, 083, 084, 052, 063, 066, 080, 069, 114, 060, 020, 064, 065, 110, 087, 017, 031, 053, 051, 018, 023, 054. |
| <b>Grupo 2</b>         | TG 072                                                                                                                                                                                            |
| <b>Grupo 3</b>         | TG: 107, 108, 117, 118, 130, 131, 095.                                                                                                                                                            |
| <b>Grupo 4</b>         | TG: 061, 062, 002, 014, 046, 015, 050, 125, 022, 021, 091, 112, 093, 097, 047.                                                                                                                    |
| <b>Grupo 5</b>         | TG: 126                                                                                                                                                                                           |
| <b>Grupo 6</b>         | TG: 089, 119, 120, 088, 007                                                                                                                                                                       |
| <b>Grupo 7</b>         | TG: 104, 105, 106, 008, 123                                                                                                                                                                       |
| <b>Grupo 8</b>         | TG: 122                                                                                                                                                                                           |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla A27. Matriz de datos para la elaboración de dendrograma (Ver página siguiente)**



**ANEXO B**  
**ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

**Tabla B1. Análisis de varianza para el logaritmo del número de unidades formadoras de colonia por gramo seco.**

| Fuente de variación | g.l | SC     | CM     | Fc       | Probabilidad |
|---------------------|-----|--------|--------|----------|--------------|
| Factor A            | 1   | 63.716 | 63.716 | 9040.429 | 0.000**      |
| Factor B            | 3   | 33.339 | 11.113 | 1576.758 | 0.000**      |
| AB                  | 3   | 0.498  | 0.166  | 23.536   | 0.0003**     |
| Error               | 8   | 0.056  | 0.007  |          |              |
| Total               | 15  | 97.609 |        |          |              |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla B2. Separación de medias para el número de unidades formadoras de colonia por gramo seco.**

**FACTOR B**

| Niveles |                | Medias                | Rango |
|---------|----------------|-----------------------|-------|
| b0      | Agar nutritivo | $2.09 \times 10^{11}$ | A     |
| b1      | Agar Gasolina  | $6.77 \times 10^8$    | B     |
| b3      | Agar GYM       | $7.50 \times 10^7$    | C     |
| b2      | Agar GYEA      | $6.45 \times 10^7$    | D     |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla B3. Separación de medias de la interacción tipo de suelo y medios de cultivo de los ufc/g de suelo seco**

**INTERACCIÓN AB**

|      | <b>Tratamientos</b>             | <b>Medias</b>         | <b>Rango</b> |
|------|---------------------------------|-----------------------|--------------|
| a0b0 | Suelo arenoso, Agar nutritivo   | 4.19x10 <sup>11</sup> | A            |
| a0b1 | Suelo arenoso, Agar Gasolina    | 1.35x10 <sup>9</sup>  | B            |
| a0b3 | Suelo arenoso, Agar GYM         | 1.50x10 <sup>8</sup>  | C            |
| a0b2 | Suelo arenoso, Agar GYEA        | 1.29x10 <sup>8</sup>  | C            |
| a1b0 | Suelo arcilloso, Agar nutritivo | 3.15x10 <sup>7</sup>  | D            |
| a1b1 | Suelo arcilloso, Agar gasolina  | 5.20x10 <sup>5</sup>  | E            |
| a1b3 | Suelo arcilloso, Agar GYM       | 1.35x10 <sup>4</sup>  | F            |
| a1b2 | Suelo arcilloso, Agar GYEA      | 5.13x10 <sup>3</sup>  | G            |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla B4. Análisis de varianza para la diversidad de colonias**

| <b>Fuente de variación</b> | <b>g.l</b> | <b>SC</b> | <b>CM</b> | <b>Fc</b> | <b>Probabilidad</b> |
|----------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|---------------------|
| Factor A                   | 1          | 0.250     | 0.250     | 0.200     | n.s                 |
| Factor B                   | 3          | 101.500   | 33.833    | 27.066    | 0.0002**            |
| AB                         | 3          | 116.250   | 38.750    | 31.000    | 0.0001**            |
| Error                      | 8          | 10.000    | 1.250     |           |                     |
| Total                      | 15         | 228.000   |           |           |                     |

Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012.

**Tabla B5. Separación de medias de la diversidad de colonias.**

**FACTOR B**

| <b>Niveles</b> |                | <b>Medias</b> | <b>Rango</b> |
|----------------|----------------|---------------|--------------|
| b0             | Agar Nutritivo | 10            | A            |
| b1             | Agar Gasolina  | 8             | A            |
| b3             | Agar GYM       | 5             | B            |
| b2             | Agar GYEA      | 4             | B            |

Elaborado por: Tatiana Gaviláñez, 2012.

**Tabla B6. Separación de medias de la interacción tipo de suelo y medios de cultivo de la diversidad de colonias presentes en los platos de aislamiento.**

**INTERACCIÓN AB**

|      | <b>Tratamientos</b>             | <b>Medias</b> | <b>Rango</b> |
|------|---------------------------------|---------------|--------------|
| a1b0 | Suelo arenoso, Agar nutritivo   | 14            | A            |
| a0b1 | Suelo arenoso, Agar Gasolina    | 11            | A            |
| a0b0 | Suelo arenoso, Agar GYM         | 6             | B            |
| a1b3 | Suelo arenoso, Agar GYEA        | 6             | B            |
| a0b2 | Suelo arcilloso, Agar nutritivo | 5             | B            |
| a1b1 | Suelo arcilloso, Agar gasolina  | 5             | B            |
| a0b3 | Suelo arcilloso, Agar GYM       | 4             | B            |
| a1b2 | Suelo arcilloso, Agar GYEA      | 3             | B            |

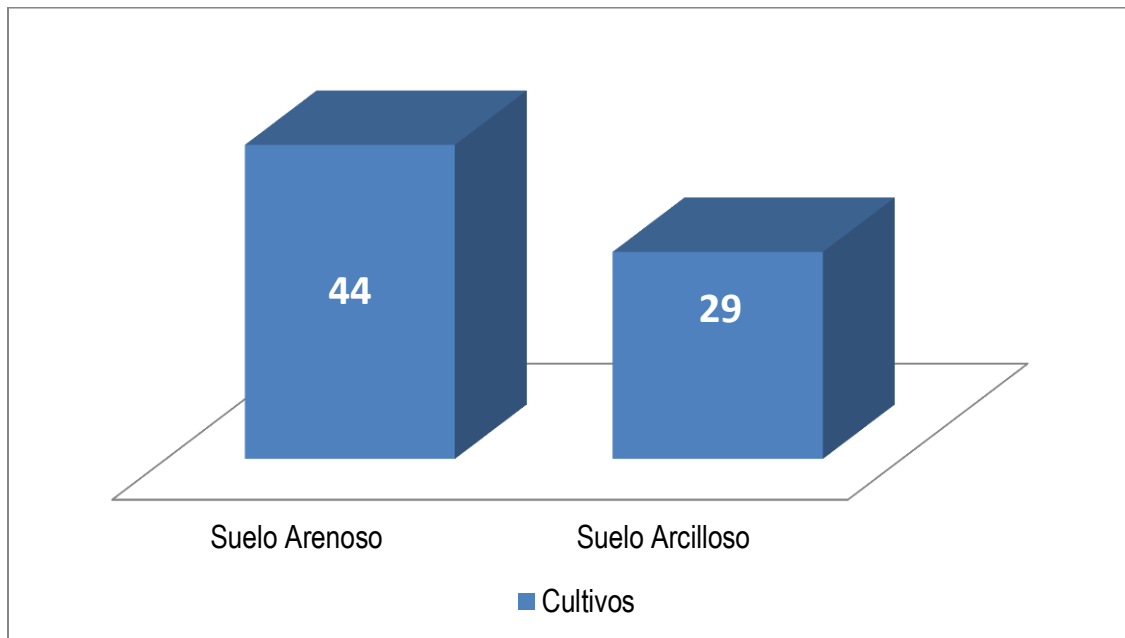
Elaborado por: Tatiana Gaviláñez, 2012.

# **ANEXO C**

# **GRÁFICOS**

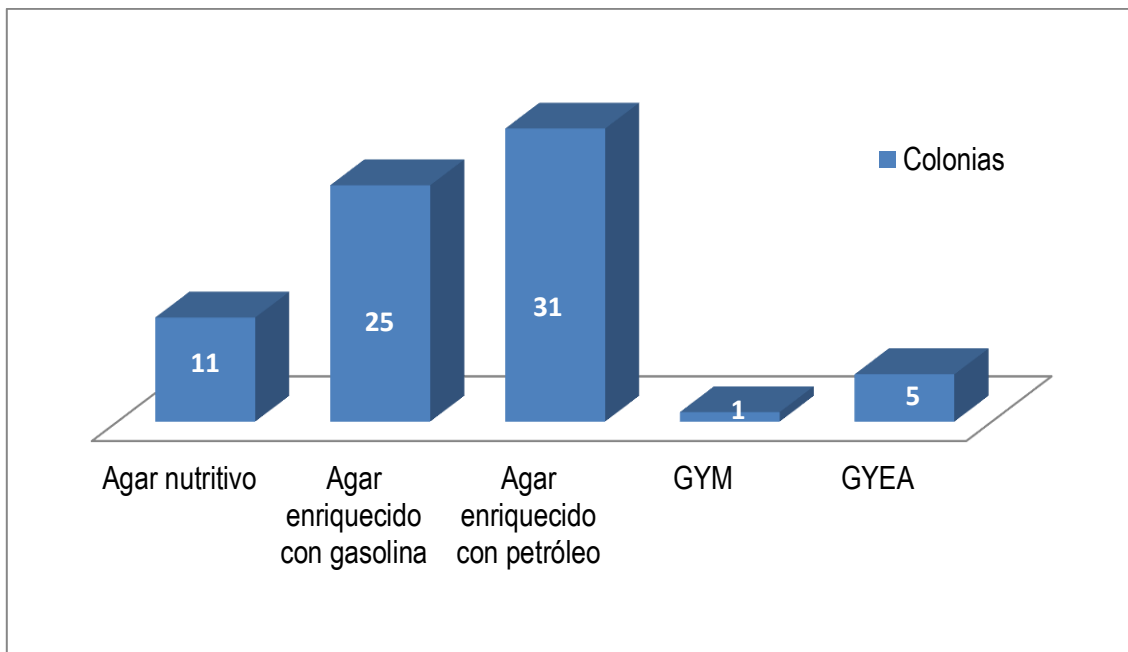


**Figura C1. Bacterias aisladas selectivamente a partir de los suelos contaminados**



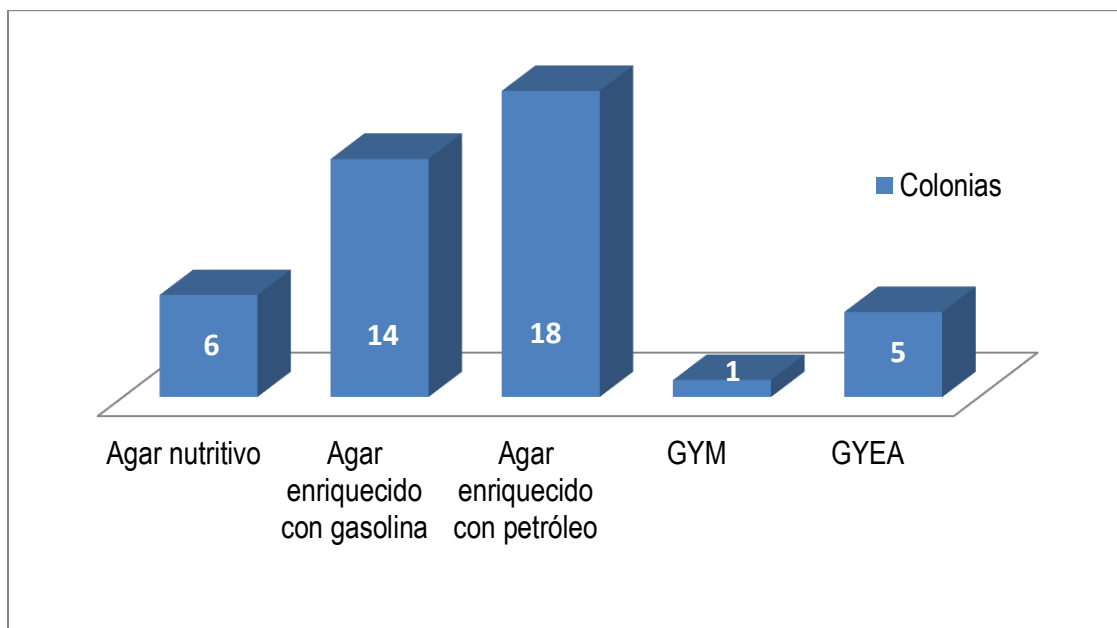
Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012

**Figura C2. Bacterias aisladas selectivamente a partir de los suelos contaminados en los diferentes medios utilizados**



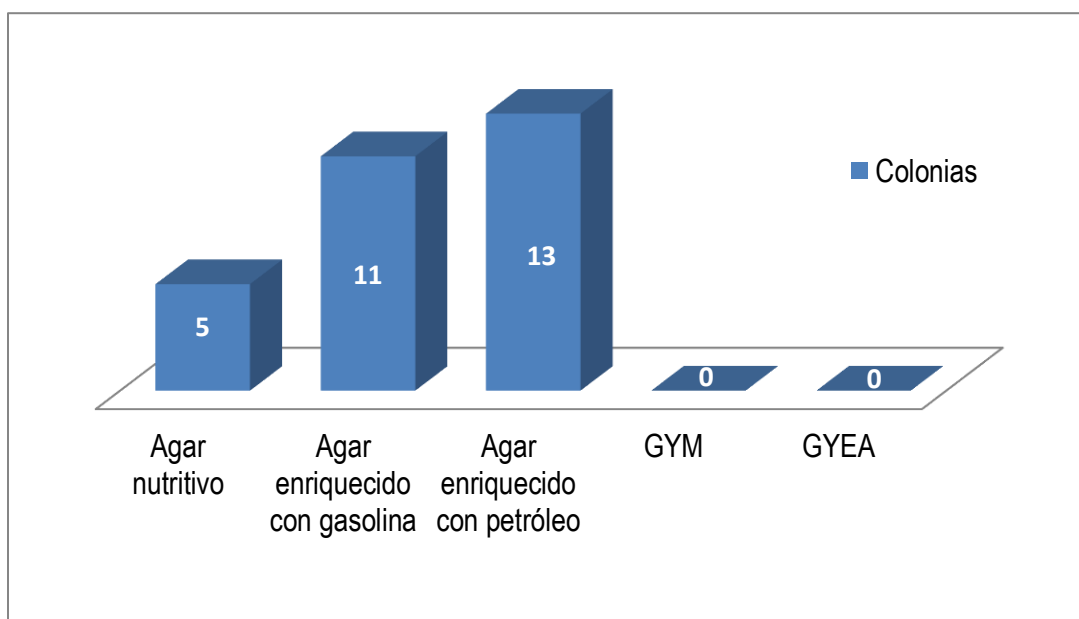
Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012

**Figura C3. Bacterias aisladas selectivamente a partir de Suelo Arenoso con 46.000 TPHs en los diferentes medios utilizados**



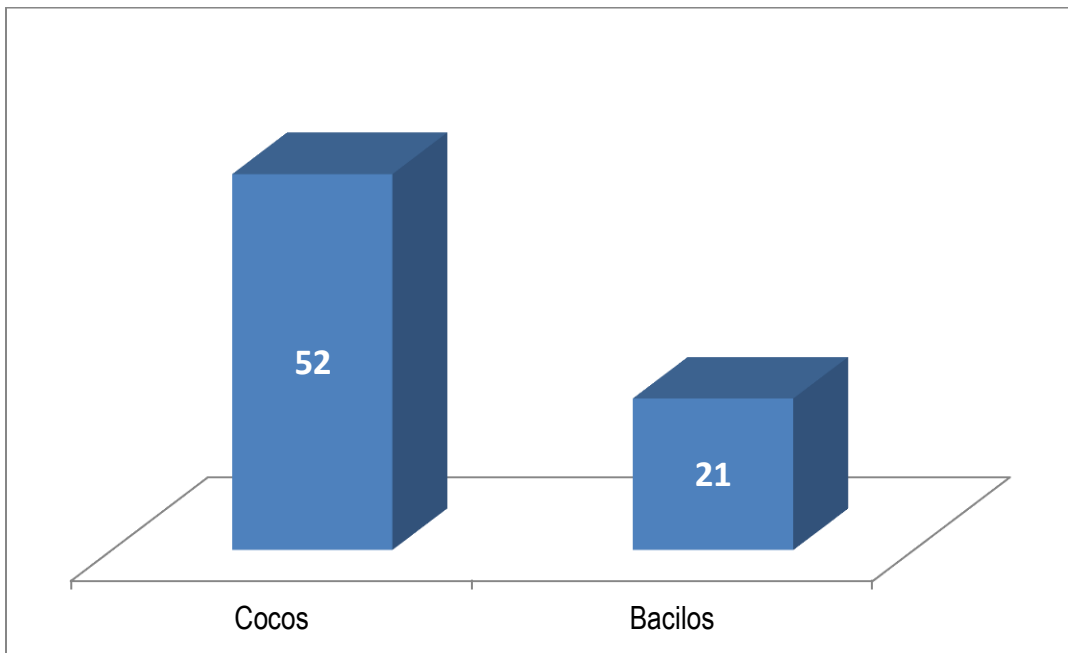
Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012

**Figura C4. Bacterias aisladas selectivamente a partir de Suelo Arcilloso con 31.000 TPHs en los diferentes medios utilizados**



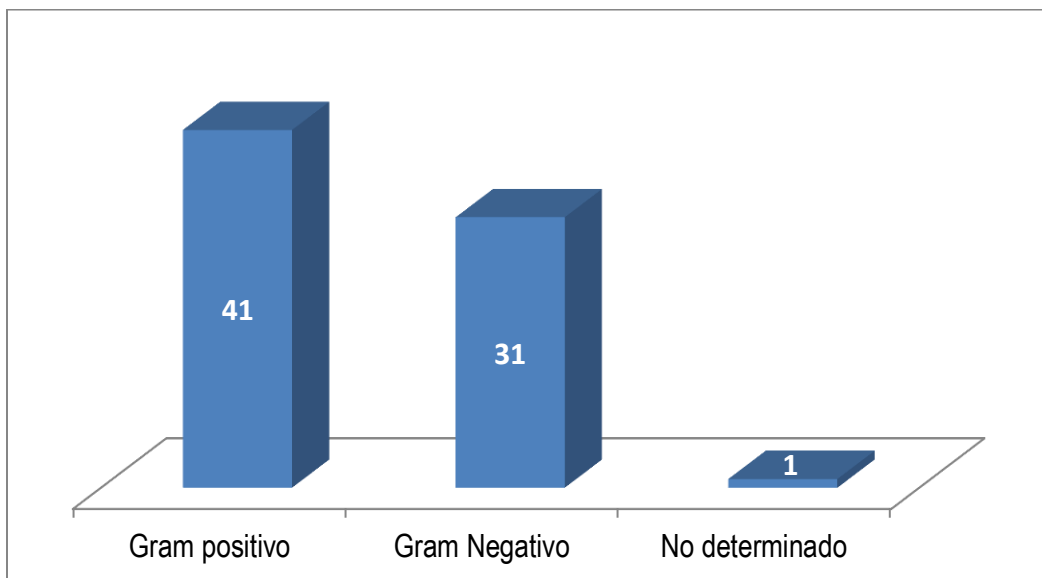
Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012

**Figura C5. Bacterias aisladas clasificadas según su forma**



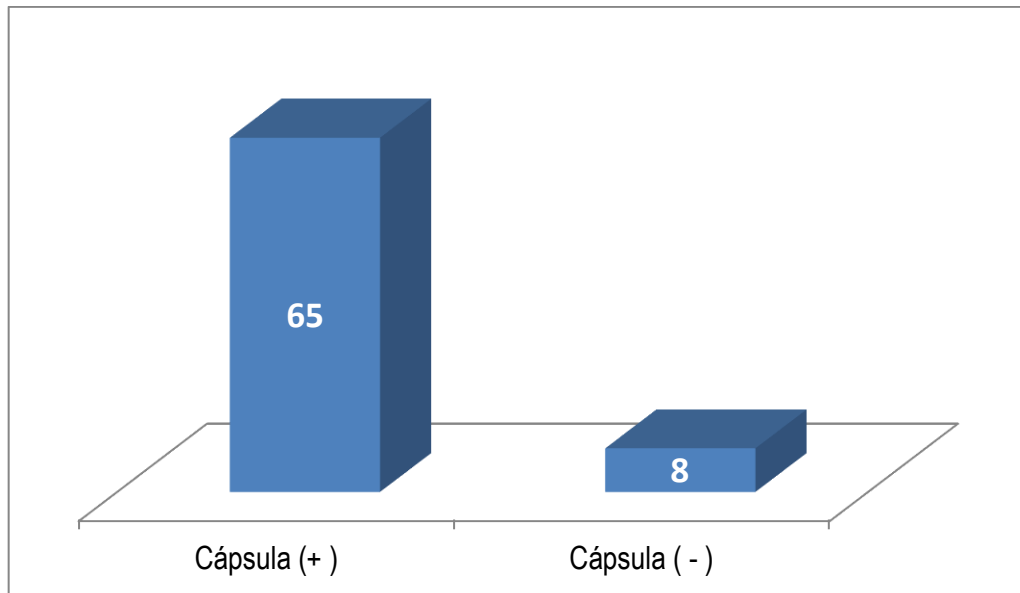
Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012

**Figura C6. Número de bacterias que presentaron Tinción de Gram positiva o negativa**



Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012

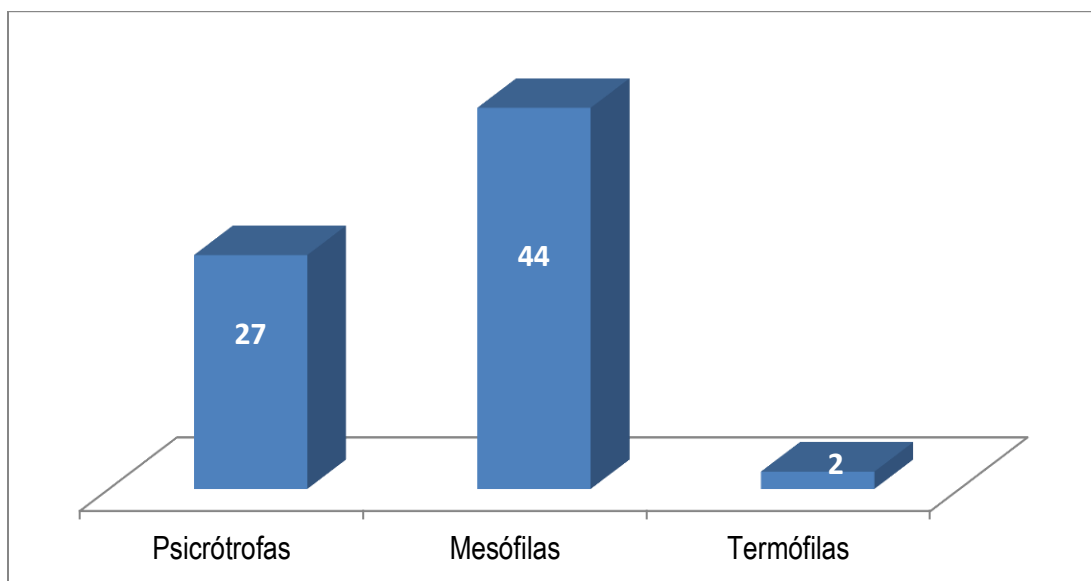
**Figura C7. Número de bacterias que presentaron Tinción de cápsulas positiva o negativa**



Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012

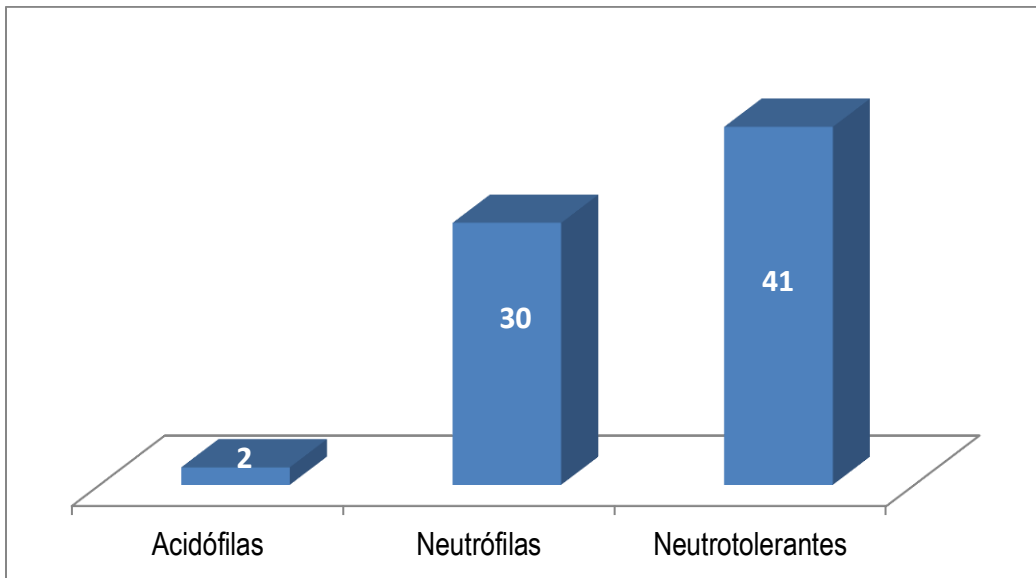
### Pruebas bioquímicas y fisiológicas

**Figura C8. Número de bacterias aisladas de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura**



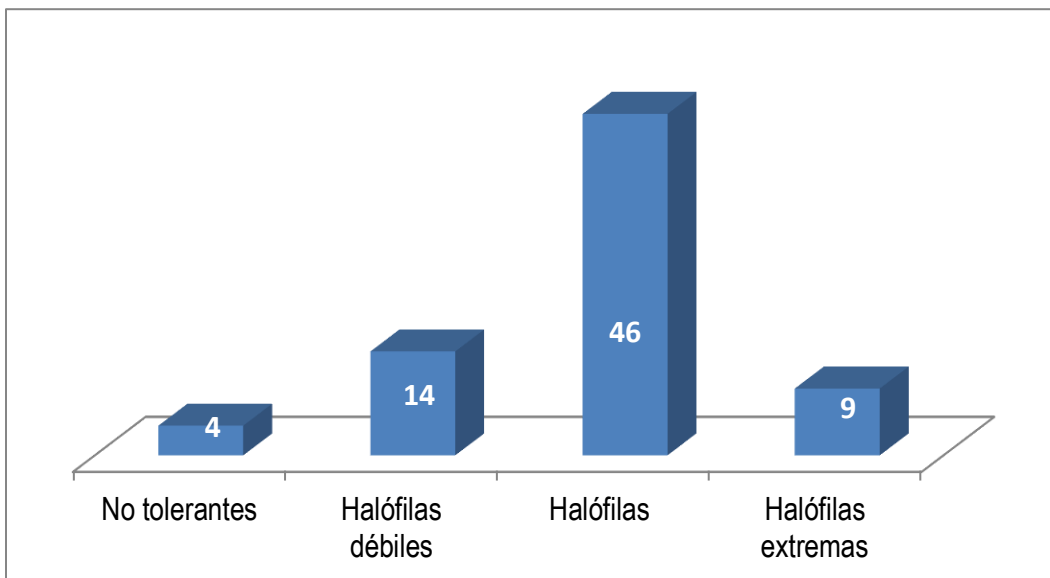
Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012

**Figura C9. . Número de bacterias aisladas de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH**



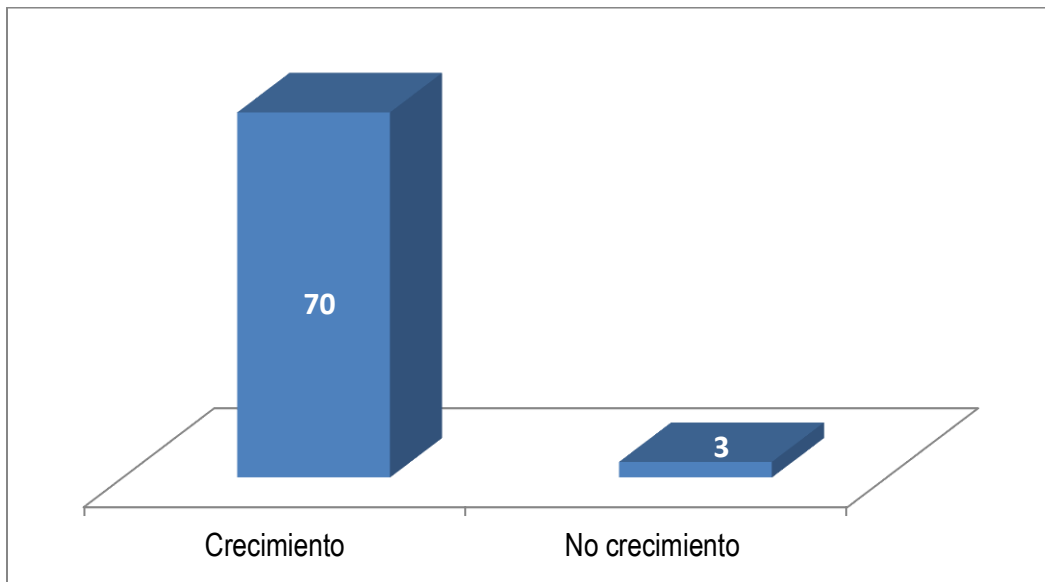
Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012

**Figura C10. Número de bacterias aisladas de acuerdo al rango de crecimiento en función de la salinidad**



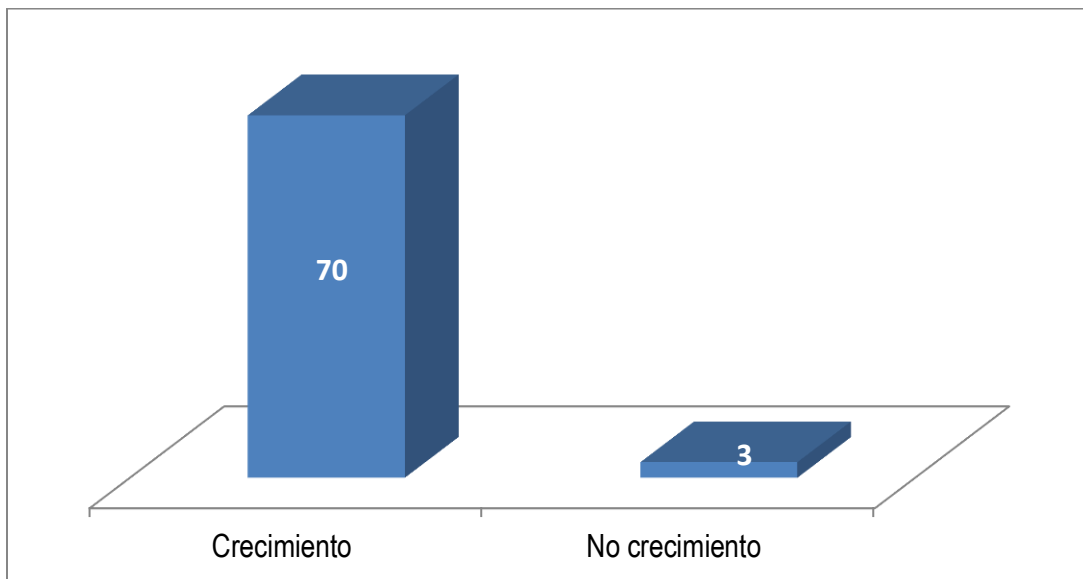
Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012

**Figura C11. Pruebas de crecimiento en medio enriquecido con petróleo**



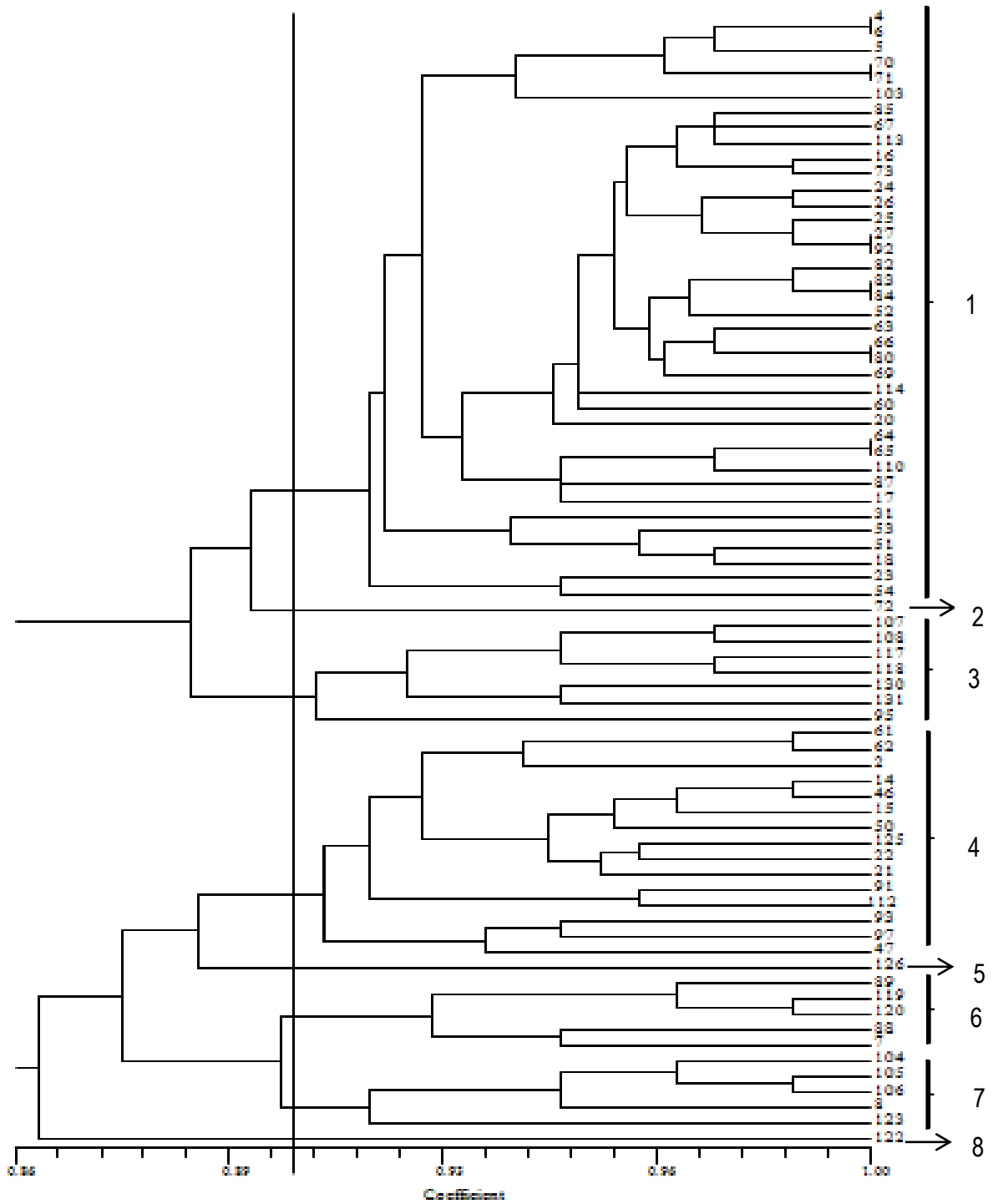
Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012

**Figura C12. Pruebas de crecimiento en medio enriquecido con gasolina**



Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012

**FIGURA C13. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de las bacterias aislados en este estudio**



Elaborado por: Tatiana Gavilánez, 2012

**ANEXO D**

**MEDIOS DE CULTIVO Y**

**SOLUCIONES**



### Medios de Cultivo y Soluciones

#### **Agar GYM (Glucose yeast extract malt agar – Agar Glucosa levadura extracto de malta)**

---

|                      |            |
|----------------------|------------|
| Glucosa              | 4.00 g     |
| Extracto de levadura | 10.00 g    |
| Extracto de malta    | 10.00 g    |
| CaCO <sub>3</sub>    | 2.00 g     |
| Agar                 | 15.00 g    |
| Agua                 | 1000.00 ml |

---

#### **Agar GYEA (Glucose yeast extract agar- Agar extracto de levadura glucosa)**

---

|                      |            |
|----------------------|------------|
| Glucosa              | 20.00 g    |
| Extracto de levadura | 20.00 g    |
| Agar                 | 15.00 g    |
| Agua                 | 1000.00 ml |

---

#### **Agar Nutritivo**

---

|                |            |
|----------------|------------|
| Agar Nutritivo | 23.00 g    |
| Agua           | 1000.00 ml |

---

#### **Medio enriquecido con Hidrocarburos (1lt)**

---

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| KNO <sub>3</sub>                | 2.00 g     |
| Hidrocarburo*                   | 5.00 ml    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 4.00 g     |
| Agar                            | 15.00 g    |
| Sales traza                     | 1.00 ml    |
| Agua                            | 1000.00 ml |

---

**Sales Traza 1ml/lt**

- Sulfato de Magnesio
  - Sulfato de Hierro
  - Sulfato de Cobre
  - Sulfato de Manganeso
  - Sulfato de Zinc
- } Pesar 100mg de cada compuesto  
diluir en 100 ml de agua destilada.

(\* = Petróleo, Gasolina, Diesel)

**Sistema de Búfers**

**Búfer de Fosfato di Básico de Sodio y Ácido Cítrico**

Solución de Ácido cítrico 0.1 M (PM: 210.14 g)

Solución de Fosfato di básico de Sodio 0.2 M (PM: 141.98 g)

Se prepara un volumen final de 100 ml:

| pH  | 0.1 M Ácido Cítrico (ml) | 0.2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (ml) |
|-----|--------------------------|---------------------------------------------|
| 2.6 | 89.10                    | 10.90                                       |
| 3.0 | 79.45                    | 20.55                                       |
| 3.5 | 69.75                    | 30.25                                       |
| 4.0 | 61.45                    | 38.55                                       |
| 4.5 | 54.57                    | 45.43                                       |
| 5.0 | 48.50                    | 51.50                                       |
| 5.5 | 43.13                    | 56.87                                       |
| 6.0 | 36.85                    | 63.15                                       |
| 6.5 | 29.04                    | 70.96                                       |
| 7.0 | 17.65                    | 82.35                                       |
| 7.5 | 7.62                     | 92.38                                       |

### Búfer de Hidróxido de Sodio y Ácido Bórico

Solución de Hidróxido de Sodio 0.2 M (PM: 40.00 g)

Solución de Ácido Bórico 0.2 M (PM: 61.80 g)

Se prepara un volumen final de 100 ml:

| <b>pH</b> | <b>0.2 M Ácido Bórico<br/>(ml)</b> | <b>0.2 M NaOH<br/>(ml)</b> |
|-----------|------------------------------------|----------------------------|
| 8.5       | 75.00                              | 25.00                      |
| 9.5       | 55.00                              | 45.00                      |

**ANEXO E**  
**TABLA DE COLORES**

## Tabla de colores de Acrilex

### Mates – Ref.: 04140, 04125 y 04106

|                                                                                                                               |                                                                                                                                 |                                                                                                                                 |                                                                                                                               |                                                                                                                               |                                                                                                                                |                                                                                                                                |                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  500 <input type="checkbox"/> Incoloro       |  519 <input type="checkbox"/> Blanco           |  529 <input type="checkbox"/> Marfil           |  538 <input type="checkbox"/> Amarillo Piel  |  535 <input type="checkbox"/> Azul Mar       |  560 <input type="checkbox"/> Azul Caribe    |  503 <input type="checkbox"/> Azul Celeste  |  584 <input type="checkbox"/> Azul Invierno  |
|  566 <input type="checkbox"/> Melocotón      |  518 <input type="checkbox"/> Salmón           |  589 <input type="checkbox"/> Amarillo Canario |  504 <input type="checkbox"/> Amarillo Limón |  501 <input type="checkbox"/> Azul Turquesa  |  543 <input type="checkbox"/> Azul Ultramar  |  502 <input type="checkbox"/> Azul Cobalto  |  544 <input type="checkbox"/> Azul Marino    |
|  505 <input type="checkbox"/> Amarillo Oro   |  536 <input type="checkbox"/> Amarillo Cadmio  |  517 <input type="checkbox"/> Naranja          |  801 <input type="checkbox"/> Mandarina      |  552 <input type="checkbox"/> Verde Glacial  |  803 <input type="checkbox"/> Acqua Marina   |  802 <input type="checkbox"/> Verde Manzana |  510 <input type="checkbox"/> Verde Hoja     |
|  586 <input type="checkbox"/> Coral          |  507 <input type="checkbox"/> Rojo Fuego       |  541 <input type="checkbox"/> Rojo Vivo        |  583 <input type="checkbox"/> Rojo Tomate    |  572 <input type="checkbox"/> Verde Aguacate |  570 <input type="checkbox"/> Verde Pistache |  513 <input type="checkbox"/> Verde Musgo   |  582 <input type="checkbox"/> Verde Gramo    |
|  508 <input type="checkbox"/> Rojo Escarlata |  805 <input type="checkbox"/> Guayaba Quemada  |  550 <input type="checkbox"/> Púrpura          |  509 <input type="checkbox"/> Rojo Carmim    |  512 <input type="checkbox"/> Verde Veronese |  545 <input type="checkbox"/> Verde Oliva    |  511 <input type="checkbox"/> Verde Bandera |  546 <input type="checkbox"/> Verde Pino     |
|  588 <input type="checkbox"/> rojo Quemado   |  565 <input type="checkbox"/> Vino             |  537 <input type="checkbox"/> Rosa             |  567 <input type="checkbox"/> Rosa Té        |  573 <input type="checkbox"/> Ocre Oro       |  539 <input type="checkbox"/> Sienna Natural |  569 <input type="checkbox"/> Caramelo      |  506 <input type="checkbox"/> Cerámica       |
|  542 <input type="checkbox"/> Rosa Oscuro    |  549 <input type="checkbox"/> Magenta          |  804 <input type="checkbox"/> Fuchsia          |  587 <input type="checkbox"/> Lavanda        |  585 <input type="checkbox"/> Capuccino      |  807 <input type="checkbox"/> Jacarandá      |  531 <input type="checkbox"/> Marrón        |  514 <input type="checkbox"/> Tierra Tostada |
|  528 <input type="checkbox"/> Lila          |  540 <input type="checkbox"/> Violeta Cobalto |  516 <input type="checkbox"/> Violeta         |  568 <input type="checkbox"/> Azul Cerúleo  |  551 <input type="checkbox"/> Sepia         |  574 <input type="checkbox"/> Gris Lunar    |  520 <input type="checkbox"/> Negro        |                                                                                                                                 |

### Metálicos - Ref.: 04340

|                                                                                                                         |                                                                                                                        |                                                                                                                           |                                                                                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  562 <input type="checkbox"/> Blanco |  533 <input type="checkbox"/> Plata |  553 <input type="checkbox"/> Amarillo |  532 <input type="checkbox"/> Oro   |
|  534 <input type="checkbox"/> Cobre  |  555 <input type="checkbox"/> Rojo  |  559 <input type="checkbox"/> Azul     |  557 <input type="checkbox"/> Verde |

### Fluorescentes - Ref.: 04040

|                                                                                                                                 |                                                                                                                               |                                                                                                                       |                                                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  102 <input type="checkbox"/> Amarillo Limón |  108 <input type="checkbox"/> Amarillo Oro |  103 <input type="checkbox"/> Rojo |  107 <input type="checkbox"/> Rosado |
|  109 <input type="checkbox"/> Azul           |  101 <input type="checkbox"/> Verde        |                                                                                                                       |                                                                                                                         |

### Glitter - Ref.: 05040 y 05025

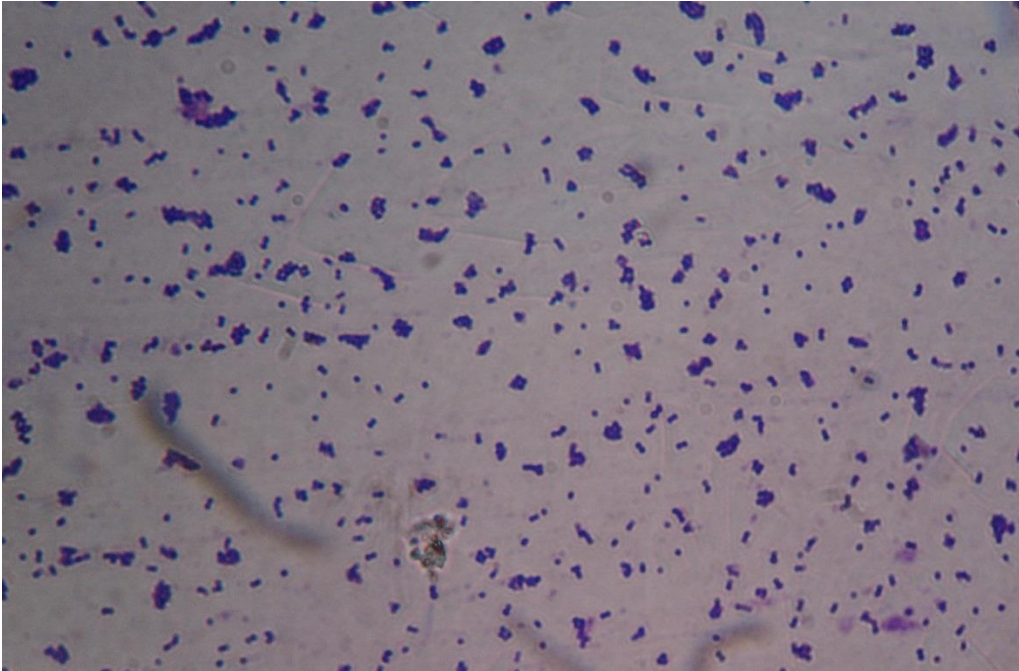
|                                                                                                                                |                                                                                                                         |                                                                                                                                    |                                                                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  209 <input type="checkbox"/> Cristal       |  202 <input type="checkbox"/> Plata |  212 <input type="checkbox"/> Amarillo        |  201 <input type="checkbox"/> Oro     |
|  203 <input type="checkbox"/> Cobre         |  205 <input type="checkbox"/> Rojo  |  214 <input type="checkbox"/> Rose            |  207 <input type="checkbox"/> Violeta |
|  211 <input type="checkbox"/> Azul Turquesa |  204 <input type="checkbox"/> Azul  |  213 <input type="checkbox"/> Verde Esmeralda |  206 <input type="checkbox"/> Verde   |

**ACRILEX®**

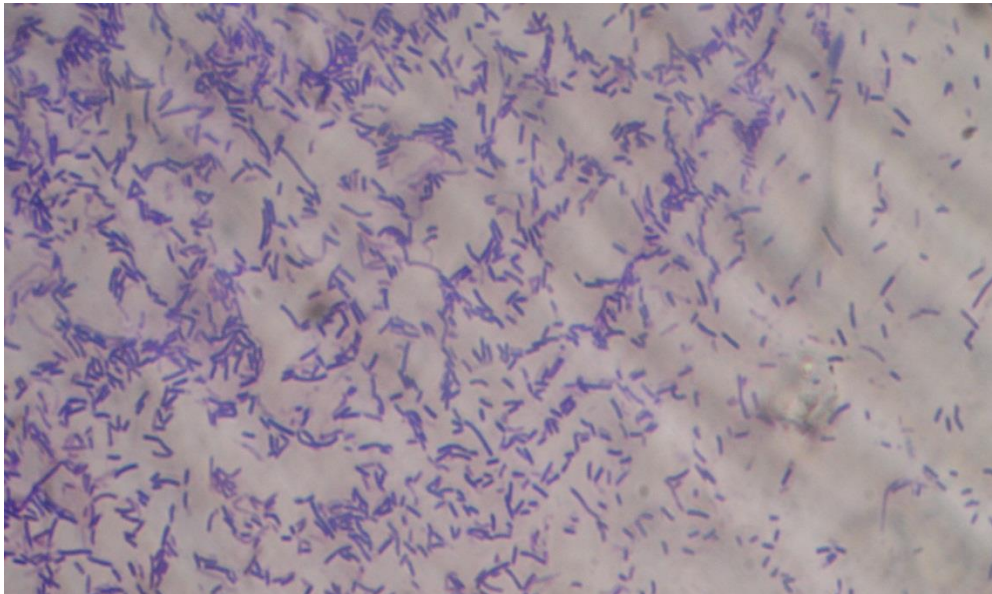
# **ANEXO F**

# **FOTOGRAFÍAS**

**Fotografía 1.** Tinción de Gram (bacteria Gram positiva, coco)

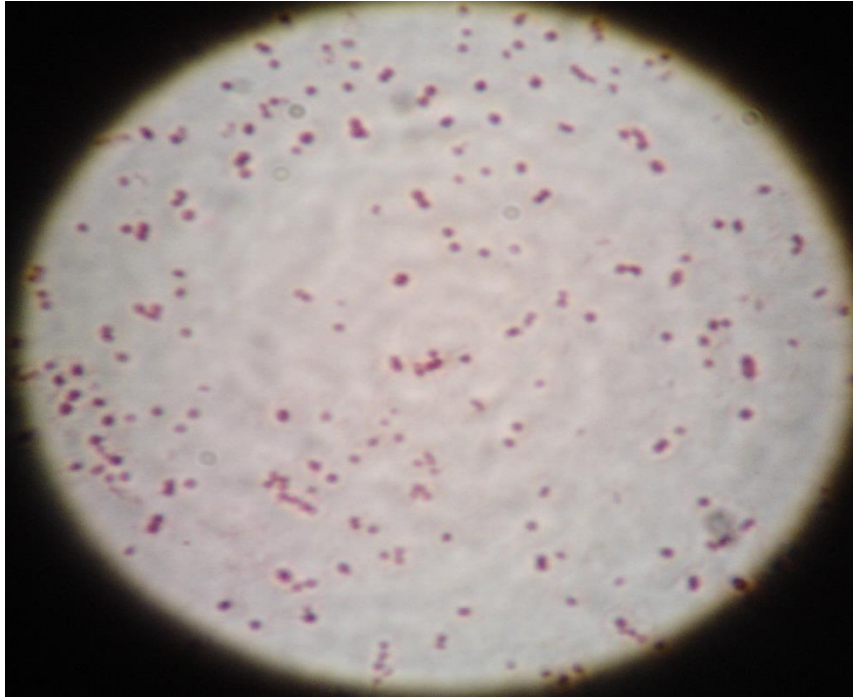


**Fotografía 2.** Tinción de Gram (bacteria gram positiva, bacilo)





**Fotografía 3.** Tinción de Gram (bacteria gram negativa, coco)

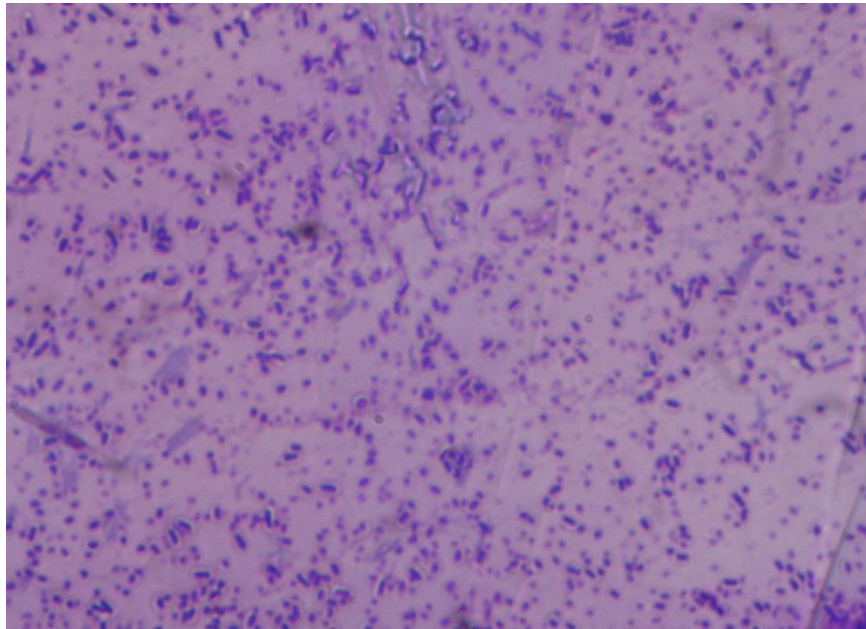


**Fotografía 4.** Tinción de Gram (bacteria gram negativa, bacilo)

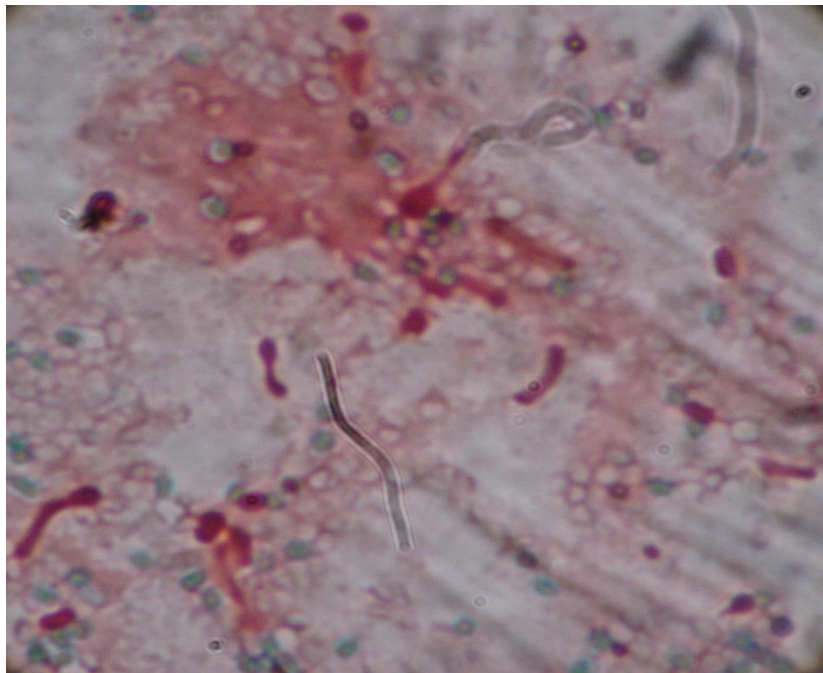




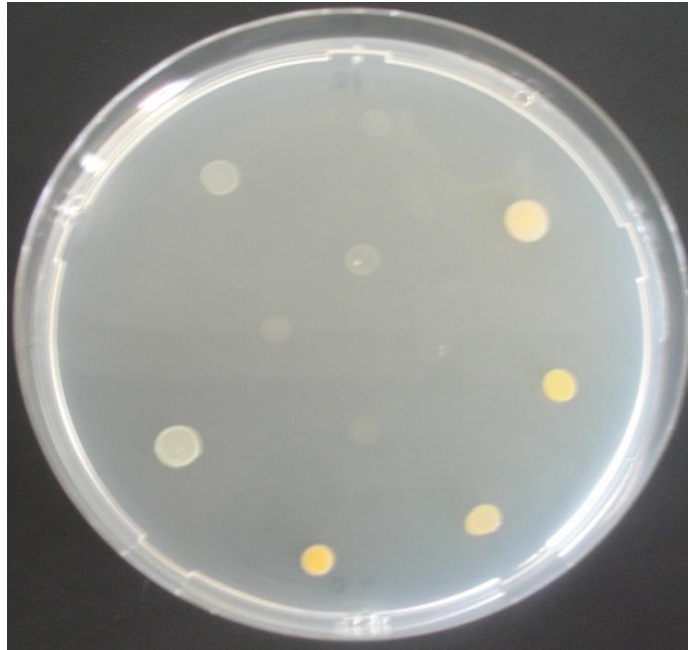
**Fotografía 5.** Tinción de cápsulas



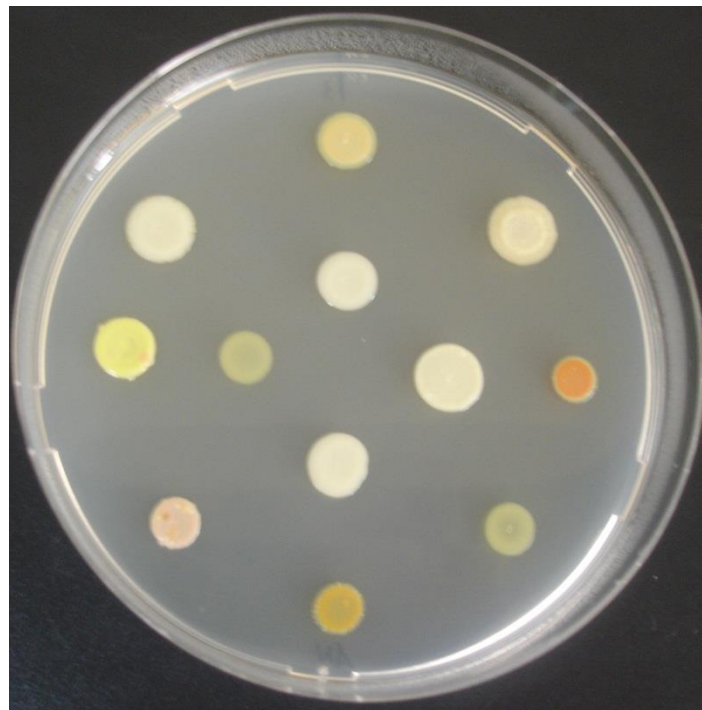
**Fotografía 6.** Tinción de endosporas



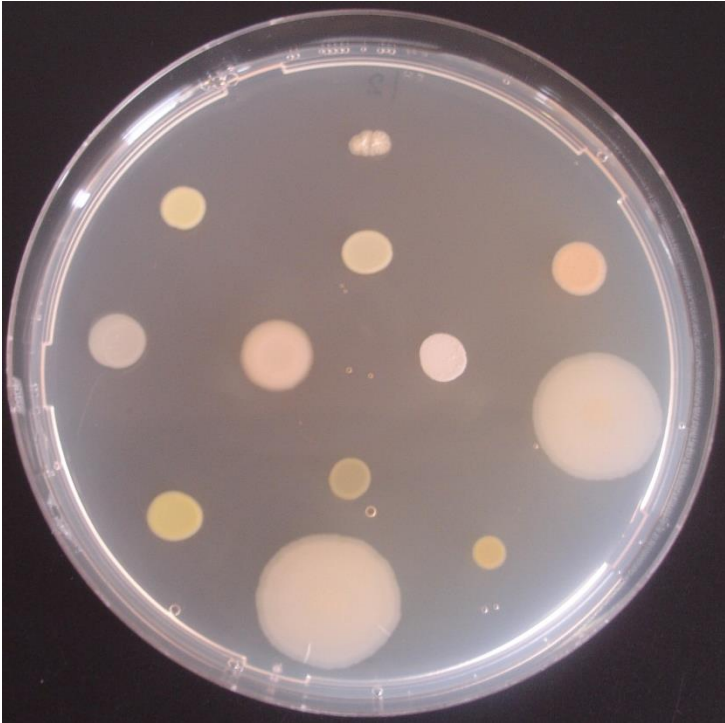
**Fotografía 7.** Crecimiento de bacterias a temperatura de 4°C



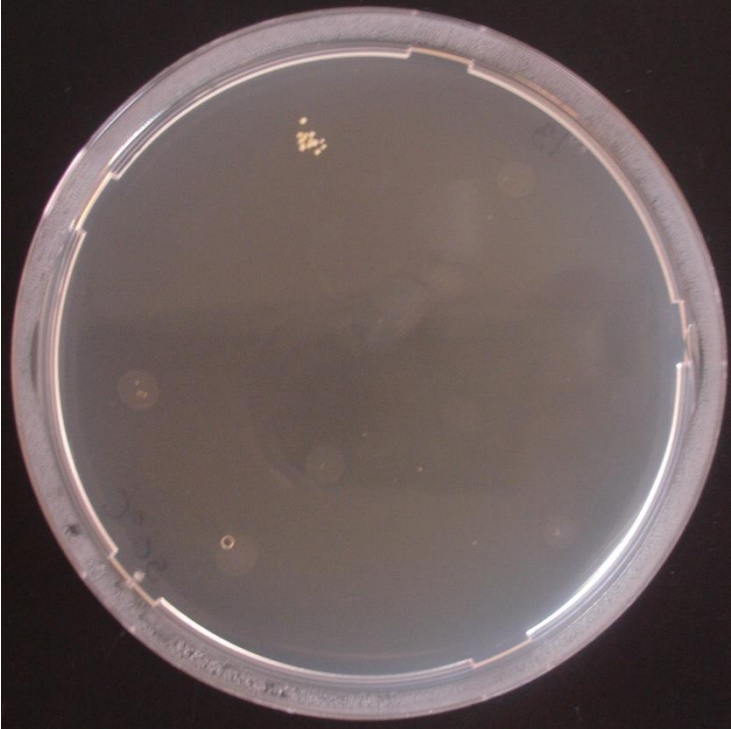
**Fotografía 8.** Crecimiento de bacterias a temperatura de 28°C



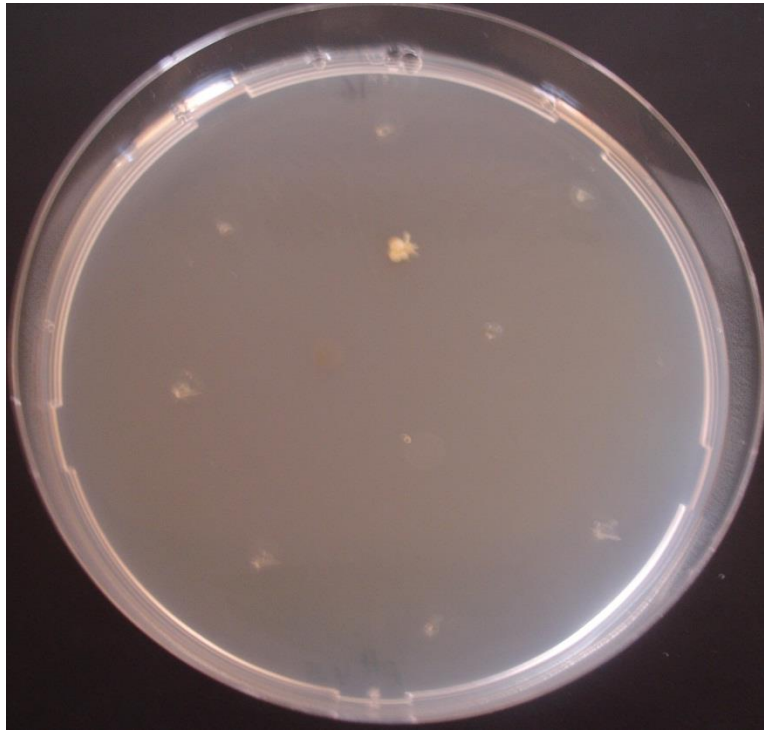
**Fotografía 9.** Crecimiento de bacterias a temperatura de 37°C



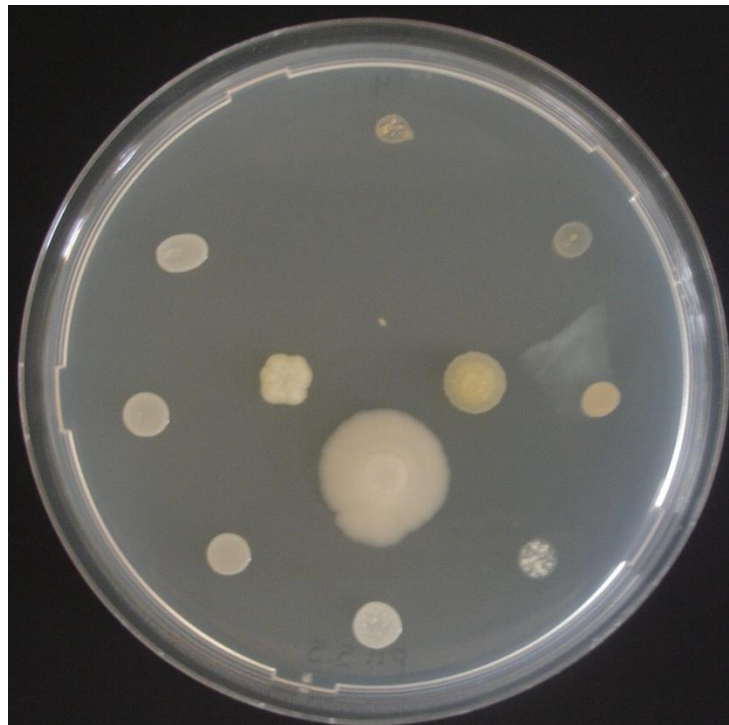
**Fotografía 10.** Crecimiento de bacterias a temperatura de 50°C



**Fotografía 11.** Crecimiento de bacterias a pH 4.5

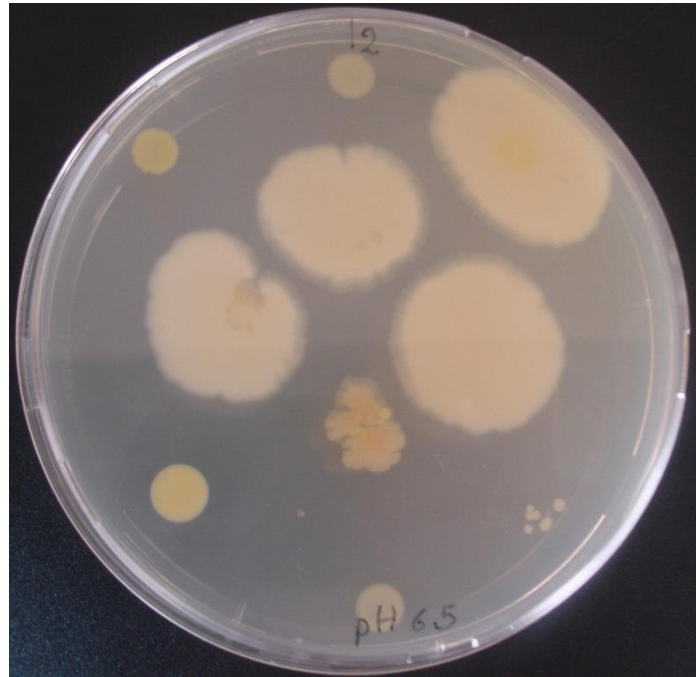


**Fotografía 12.** Crecimiento de bacterias a pH 5.5

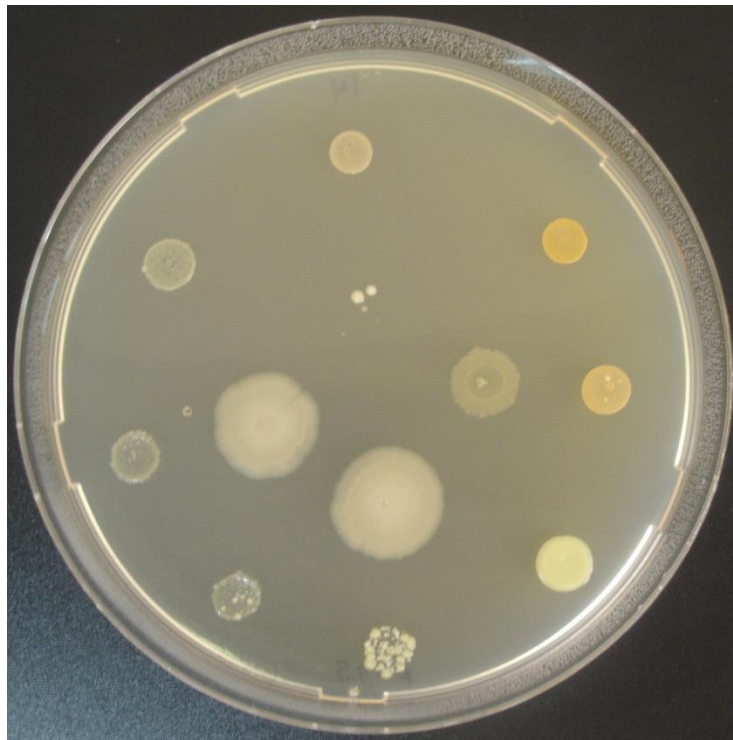




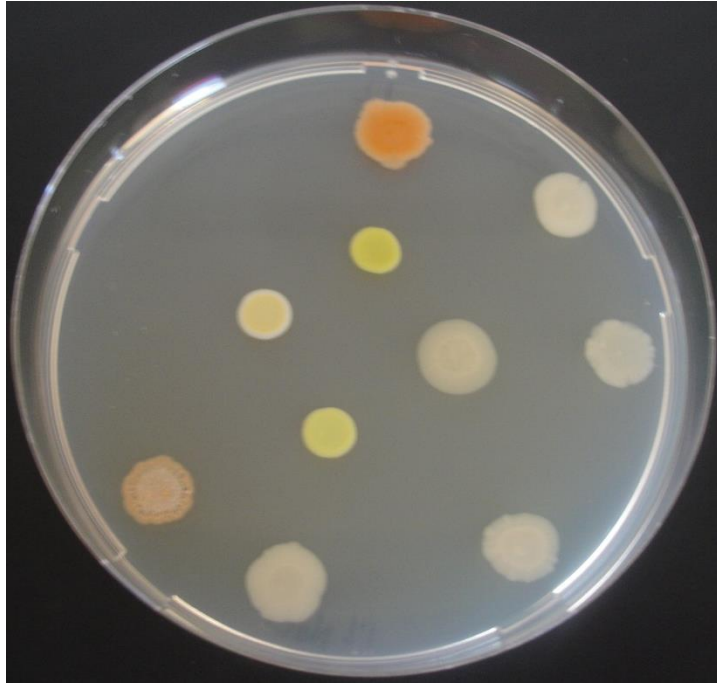
**Fotografía 13.** Crecimiento de bacterias a pH 6.5



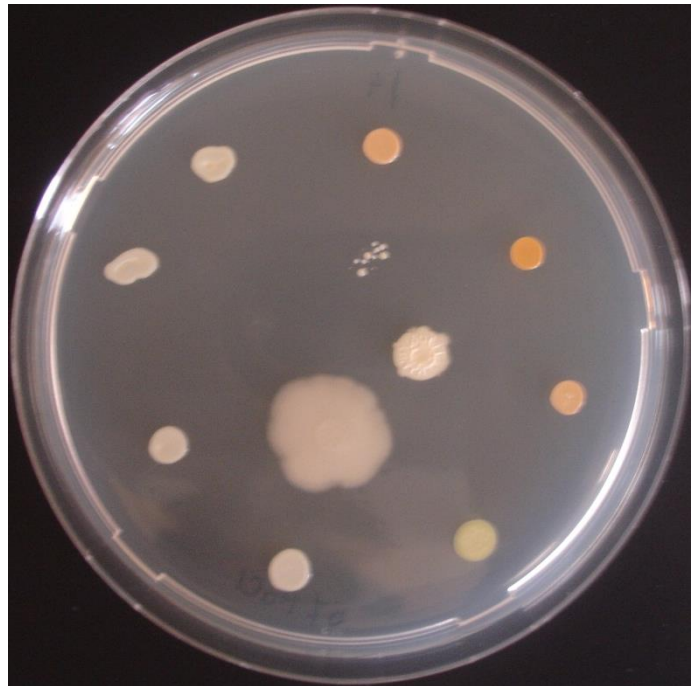
**Fotografía 14.** Crecimiento de bacterias a pH 7.5



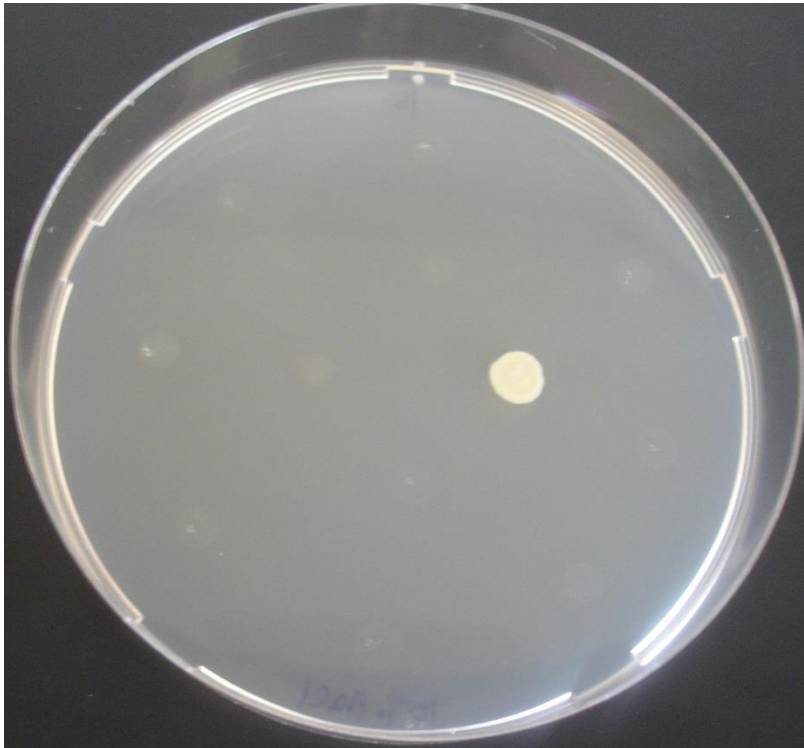
**Fotografía 15.** Crecimiento de bacterias en 1% de Cloruro de sodio



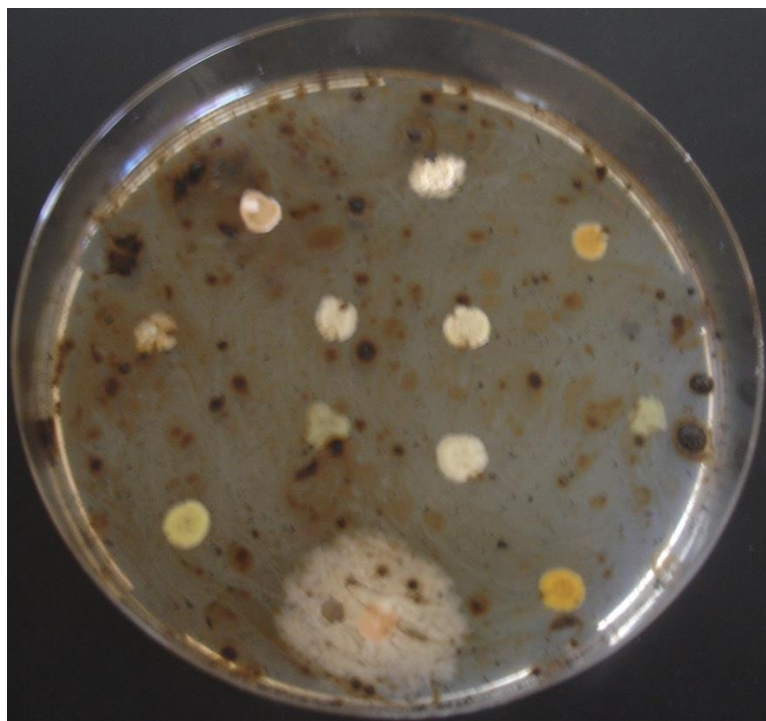
**Fotografía 16.** Crecimiento de bacterias en 5% de Cloruro de sodio



**Fotografía 17.** Crecimiento de bacterias en 10% de Cloruro de sodio



**Fotografía 18.** Crecimiento de bacterias en medio enriquecido con petróleo



**Fotografía 19.** Crecimiento de bacterias en medio enriquecido con gasolina.

