



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

**“IDENTIFICACIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO PARA LA
RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR
HIDROCARBUROS”**

Mariela Elizabeth Santizo Sáenz

Asesorado por: Msc Ing. Zenón Much Santos

Guatemala, mayo de 2009

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**IDENTIFICACIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO PARA LA
RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR
HIDROCARBUROS**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA

POR:

MARIELA ELIZABETH SANTIZO SÁENZ

ASESORADO POR: INGENIERO ZENÓN MUCH SANTOS
AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

GUATEMALA, MAYO DE 2009

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE LA JUNTA DIRECTIVA

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
VOCAL I	Inga. Glenda Patricia García Soria
VOCAL II	Inga. Alba Maritza Guerrero de López
VOCAL III	Ing. Miguel Ángel Dávila Calderón
VOCAL IV	Br. José Milton De León Bran
VOCAL V	Br. Isaac Sultán Mejía
SECRETARIA	Inga. Marcia Ivónne Véliz Vargas

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
EXAMINADOR	Ing. Erwin Manuel Ortiz Castillo
EXAMINADOR	Ing. Romel Alaric Garcia Prado
EXAMINADOR	Ing. Adolfo Gramajo Antonio
SECRETARIA	Inga. Marcia Ivónne Véliz Vargas

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

Cumpliendo con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

IDENTIFICACIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO PARA LA RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS,

tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, el 21 de febrero de 2008.

Mariela Elizabeth Santizo Sáenz

AGRADECIMIENTOS

Dios

El fruto del silencio es la oración, el fruto de la oración es la fé, el fruto de la fé es el amor, el fruto del amor es el servicio, el fruto del servicio es la paz. Ante todo quiero agradecerle las innumerables bendiciones que a mi vida has regalado.

María Santísima

Mi madre del cielo, gracias por ser mi apoyo y refugio en todo momento.

Mis padres

Agradezco el amor incondicional que siempre me brindan. Si hoy me considero una mujer con valores éticos y sociales, es porque los heredé de ustedes. Gracias Mami y Papi, por cuidarme y en cada momento hacerme sentir especial y por recordarme que no podía darme el lujo de desfallecer.

Mi hermana

Amiga incondicional. Agradezco cada sonrisa, cada lágrima, cada gesto de complicidad, así como cada uno de los momentos compartidos aún en la distancia. Gracias por todo lo que haces por mí.

Mi hermano

Gracias por ser mi hermano grandote.

Mis abuelos

D.E.P. Elena Rivera, D.E.P. José Sáenz, D.E.P. Irma Rodríguez. Por los momentos que hoy son recuerdo, en mi corazón siempre vivirán. Gracias por ayudarme desde el cielo. A mi abuelo Carlos, quiero agradecerle todo el amor, confianza, ternura, fortaleza y comprensión que siempre me da.

Mi sobrino

Daniel. Gracias por darle luz a mi vida.

Mis tíos

Gracias por darme el privilegio de sentirme su hija. Especialmente quiero agradecerles a mis tíos padrinos por todo el amor, paciencia y comprensión que siempre me brindan.

Mis primos

Porque no han dejado que el significado de la familia quede solo en cinco personas.

Mis amigas

Sofía Oajaca, Carol Cabrera, Esther Roquel, Sharon Vides, Flor Roldan, Cecilia Herrera. Un amigo verdadero es alguien que llega cuando todos se van, y se queda cuando todos los demás han desaparecido. Gracias por ser mis conciencias, cómplices y hermanas. Muy especialmente quiero agradecerle a Carol. Amiga, las horas que pasaste encerrada aquel sábado desde muy temprano ayudándome no las olvido. Gracias por el apoyo que siempre me brindas.

Mis amigos

Ricardo Díaz, Hugo Agustín, Fernando Mérida, David Ortiz, Carlos y Marcos Pocón, Sergio Hernández, Ronaldo Prado, Pedro Agreda, Byron Reyes. Estos años compartidos no son en vano, porque nunca necesitaron una razón para quedarse cerca de mí. Gracias por ser mis ángeles y amigos.

Cantares

El tiempo compartido con ustedes es difícil de pasar por alto. Me siento parte de la familia. Gracias por sus oraciones, por ayudarme a crecer, los quiero mucho y siempre los llevo en mi corazón.

Luis Carlos

Gracias por aquel mapa que fue el inicio de este trabajo y de tantos momentos compartidos que siempre vivirán en mi mente y corazón.

Gracias por hacerme sentir especial y querida. Nunca olvides que aunque el tiempo siga su marcha agradezco que llegaras un buen día decidido a alborotarme la vida. Gracias por Tu cariño. Te requiero.

Mi mentor

Ing. Otto Raúl de León, mil gracias porque vio en mi más que una estudiante. Gracias por la confianza, por el apoyo moral y espiritual incluso en momentos difíciles. Agradezco cada palabra de ánimo, cada consejo, cada jalón de oreja merecido. Que Dios me lo cuide siempre.

Mi Asesor

Ing. Zenón Much Santos. Tantas cosas que agradecerle. Gracias por rescatar este trabajo de investigación que sin su ayuda no hubiera visto la luz. Gracias por el apoyo incondicional.

**Ing. Manuel de Jesús Guillen
(D.E.P.)**

Aprendí de usted tantas cosas invaluable. El tiempo y la vida no me permitieron hacerlo personalmente. Mas hoy quiero agradecerle de corazón todo lo que hizo por mí, desde donde me observa sepa que siempre lo recuerdo.

Laboratorio Empagua

Gracias por la sabiduría, paciencia y amabilidad con la que siempre me recibieron. Fue un placer sentirme parte del laboratorio. Quiero agradecer muy especialmente a Fito, por toda la paciencia que tuvo conmigo.

**Universidad de San Carlos de
Guatemala**

Mi alma mater. Agradezco todos estos años de formación. Gracias por ser mí casa de estudios. Orgullosa de ser parte de tanta historia.

ACTO QUE DEDICO A:

Dios y María

Porque nunca me desamparan. Cada gesto, cada cosa a mi vida ha llegado en el momento justo. Me han enseñado a levantarme y a ser una mujer fuerte. Mis Padres del cielo, gracias por cada acto de amor hacia esta hija suya.

Mis Padres

Irma Yolanda Sáenz Rivera y Carlos Antonio Santizo Rodríguez. A ustedes dos debo todo lo que soy y he querido ser. Porque fue su máxima el crecimiento a través del estudio y el esfuerzo. Para ustedes todo mi amor y admiración, porque siempre creyeron en mí, incluso en momentos en los que deje de hacerlo. A mis Padres las mejores palabras de la vida. Papi y Mami este logro es de y por Ustedes.

Mis hermanos

Jeaqueline Liseth y José Carlos, por ser parte importante en mi vida.

Mi abuela

D.E.P. Irma Ilusión Rodríguez Sosa. Quiero decirte que poco a poco lo logre, y aquí estoy luchando por ser aquella mujer grandota que tú querías que yo fuera; aquí no termina esta lucha. Mamita, donde estés tratare de hacerte llenar de alegrías.

Mi abuelo

Carlos Humberto Santizo Carranza. Siempre me recordaste que podía soñar más allá de mis posibilidades. A mi abuelo todo mi corazón, respeto y admiración. Hoy quiero dedicarte cada letra de este sueño hecho realidad.

Mi tía madrina

Yolanda Santizo Rodríguez. Eres mi segunda Mamá. Que Dios te bendiga por todo el apoyo incondicional que siempre me das y que hoy se ve reflejado finalmente en este trabajo.

Ing. Manuel de Jesús Guillen
(D.E.P.)

A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota. Porque usted creyó siempre en mí, quiero dedicarle este trabajo. Nos sigue uniendo el mismo tema.

Mis amigos

A todos y a cada uno, porque todos son muy especiales, hemos compartido momentos buenos y malos. Siempre los llevo en mi corazón

Luis Carlos

Se me hace difícil encontrar las palabras adecuadas para expresarme cuando se trata de Ti. Pero hoy quiero decirte lo mucho que significas y lo importante que eres en mi vida. Gracias por ser parte de ella.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	VII
LISTA DE SÍMBOLOS	XI
GLOSARIO	XIII
RESUMEN	XVII
OBJETIVOS	XXI
INTRODUCCIÓN	XXIII
1. ANTECEDENTES	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Suelo	3
2.1.1 Composición del suelo	4
2.1.2 Análisis de la composición química y mineralógica de los suelos	6
2.1.2.1 Análisis químico elemental	6
2.1.3 Importancia de la biodiversidad en el suelo	7
2.1.3.1 Componentes orgánicos de la fase sólida del suelo	7
2.1.4 Propiedades del suelo	9
2.2 Petróleo	11
2.2.1 Etimología	11
2.2.2 Formación de los hidrocarburos del petróleo	13

2.2.3	Propiedades y características del crudo extraído por región de explotación	14
2.2.3.1	Características del petróleo crudo campo: Xan	14
2.2.3.2	Características del petróleo crudo campo: Rubelsalto	15
2.2.3.3	Características del petróleo crudo campo: Chocop	16
2.2.4	Clasificación del crudo de petróleo	16
2.2.4.1	En base a su estructura molecular	17
2.2.4.2	En base a su grado API	17
2.2.5	Formación de los hidrocarburos de petróleo	18
2.2.5.1	Hidrocarburos alifáticos	19
2.2.5.1.1	Serie parafínica	19
2.2.5.1.1.1	Alcanos ramificados	19
2.2.5.1.2	Naftenos	20
2.2.5.1.3	Serie olefínica	20
2.2.5.1.4	Aromáticos	20
2.2.5.2	Clasificación con base a su estructura molecular del crudo en Guatemala extraído por región de explotación	22
2.2.6	Exploración y explotación petrolera en Guatemala	23
2.2.6.1	Reseña histórica	23
2.2.6.2	Producción petrolera	26
2.3	Suelos contaminados	28
2.3.1	Gestión ambiental en el sitio contaminado	29
2.4	Suelos contaminados con hidrocarburos	31

2.5	Relación entre los microorganismos propios del suelo y los microorganismos de un suelo contaminado por hidrocarburos	32
2.5.1	El suelo como hábitat microbiano	32
2.5.1.1	Composición generalizada de bacterias en el suelo	34
2.5.1.2	Fijación biológica asimbiótica	35
2.6	Suelos contaminados y microorganismos	36
2.6.1	Microorganismos típicos de los suelos contaminados con hidrocarburos	38
2.6.1.1	Proceso de biorremediación a través de microorganismos propios del suelo contaminado	39
2.6.1.1.1	Poblaciones microbianas mixtas	41
2.6.1.1.2	Mecanismos bioquímicos de degradación	42
2.6.1.1.3	Obtención de una microbiología optima de degradación de hidrocarburos del suelo	43
2.6.1.1.4	Clasificación de los contaminantes del petróleo	44
2.7	Estimación del potencial de biodegradación	45
2.7.1	Estimación del número de bacterias en el suelo	45
2.8	Proceso de biorremediación	46
2.8.1	Diseño de la unidad básica de tratamiento	46
2.8.1.1	Ajuste del pH del suelo	46
2.8.1.2	Ajuste del contenido de humedad en el suelo	46
2.8.1.3	Adición de fertilizantes	47
2.8.1.4	Adición de agentes	47
2.8.1.5	Remoción e irrigación	48

3. METODOLOGÍA	49
3.1 Recursos	49
3.1.1 Localización	49
3.1.2 Recursos humanos	49
3.1.3 Obtención de las muestras	50
3.1.3.1 Procesamiento de las muestras de suelo	51
3.2 Análisis de nutrientes del suelo	52
3.2.1 Determinación de nitrógeno:	
Método Semivocal Micro-Kjeldahl	52
3.2.2 Extracción de nutrientes: Método Mehlich 1 ó método del ácido doble de Carolina del Norte	54
3.3 Análisis de microorganismos degradadores presentes en el suelo	56
3.3.1 Búsqueda, aislamiento y selección	56
3.3.1.1 Búsqueda general	56
3.3.1.2 Recuento de microorganismos heterótrofos mesófilos aerobios totales en medio líquido	56
3.3.1.2.1 Determinación de crecimiento de microorganismos hidrocarburolíticos	56
3.3.1.2.2 Cálculo del número más probable	57
3.3.1.3 Búsqueda específica	58
3.3.1.3.1 Inoculación en tubos de agar inclinado	59
3.3.1.3.2 Cultivo por placa estriada	59
3.3.1.3.3 Identificación de microorganismos degradadores	61
3.3.1.3.3.1 Preparación del frotis	61
3.3.1.3.3.2 Fijación de las bacterias al portaobjetos	62

3.3.1.3.3.3	Técnica de tinción de gram	62
3.3.1.3.3.4	Examen al microscopio	63
3.3.1.3.3.5	Pruebas bioquímicas	64
3.3.1.3.5.1	Prueba de la catalasa	64
3.3.1.3.5.1.1	Método del portaobjetos	64
3.3.1.3.5.2	Prueba de la oxidasa	64
3.3.1.3.5.1.1	Método en placa directa	64
3.3.1.4	Cultivo, multiplicación y conservación de cepas microbianas capaces de degradar hidrocarburos	65
3.3.1.5	Bioaumentación y producción de cultivos	65
3.4	Herramientas para la experimentación	66
3.4.1	Materiales y equipos a utilizar	66
3.4.1.1	Materia prima	66
3.4.1.2	Cristalería	66
3.4.1.3	Equipo	67
3.4.1.4	Reactivos	69
4	RESULTADOS	73
5	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	80
	CONCLUSIONES	85
	RECOMENDACIONES	89
	BIBLIOGRAFÍA	91
	APÉNDICES	95

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1	Composición del suelo	4
2	Clasificación de los contaminantes del petróleo	44
3	Patrón de muestreo al azar en bloques	50
4	Colección y muestreo aleatorio por bloques en suelos sometidos a presencia de hidrocarburos. (ISO 10381-6, 2002) “Calidad de los suelos: muestreo”	51
5	Método de identificación de bacterias oleofílicas	60
6	Gráfico del porcentaje de bacterias hidrocarburofílicas por gramo de suelo	74
7	Gráfico del porcentaje de población microbiana por gramo de suelo respecto al tiempo (muestra No. 1)	76
8	Gráfico del porcentaje de población microbiana por gramo de suelo respecto al tiempo (muestra No. 2)	77
9	Gráfico Comparativo de la evolución de la población microbiana por gramo de suelo respecto al tiempo	78
10	Área de preparación de diluciones y cultivos	109

11	Preparación de las diluciones	110
12	Preparación del cultivo en tubos de ensayo con caldo nutritivo	111
13	Observación de la evolución de los microorganismos	112
14	Rutina de observación semanal de turbidez	113
15	Resiembras en agar utilizando cajas de petri paso previo a las tinciones de Gram	114
16	Preparación de los frotis bacterianos	115
17	Tinción de Gram sobre el frotis	116
18	Tinción de Gram y Prueba de la Catalasa	116
19	Microscopio electrónico utilizado durante el proceso experimental	117
20	Apreciación microscópica de un frotis después de la tinción de Gram	118
21	Observación pared bacteriana	119
22	Ubicación de las cuencas de explotación petrolera	120

TABLAS

I	Características del petróleo extraído campo Xan	14
II	Características del petróleo extraído campo Rubelsalto	15
III	Características del petróleo extraído campo Chocop	15
IV	Clasificación del crudo con base a su grado API	17
V	Clasificación del crudo extraído en Guatemala con base a su estructura molecular	22
VI	Composición generalizada de bacterias en el suelo	34
VII	Relación entre los microorganismos propios del suelo y los microorganismos de un suelo contaminado por hidrocarburos	37
VIII	Identificación afinidad y pruebas bioquímicas por número de muestra dilución 1.1-4.1 (diluciones positivas por duplicado)	72
IX	Identificación afinidad y pruebas bioquímicas por número de muestra dilución 4.2-10.1 (diluciones positivas por duplicado)	73
X	Identificación y aislamiento de bacterias hidrocarburohíticas en porcentaje	74

XI	Población del consorcio bacteriano propio del suelo contaminado	75
XII	Población microbiana por gramo de suelo (muestra No. 1)	75
XIII	Población microbiana por gramo de suelo (muestra No. 2)	76
XIV	Análisis químico, materia orgánica del suelo sin contaminación	78
XV	Análisis clase textural del suelo	79
XVI	Análisis químico, materia orgánica del suelo contaminado	79
XVII	Monitoreo turbidez de la muestra 1, por semana	93
XVIII	Monitoreo turbidez de la muestra 2, por semana	93
XIX	Obtención del número característico muestra 1, por semana	94
XX	Obtención del número característico muestra 2, por semana.	96
XXI	Obtención del número de microorganismos. muestra 1, por semana.	97

XXII	Obtención del número de microorganismos. muestra 2, por semana	98
XXIII	Obtención del número de microorganismos, por gramo de suelo contaminado. muestra 1, por semana	99
XXIV	Obtención del número de microorganismos, por gramo de suelo contaminado. muestra 2, por semana	100
XXV	Observaciones experimentales de las pruebas realizadas para la identificación taxonómica de los grupos bacterianos degradadores de compuestos hidrocarbonados (muestra 1.1-4.1)	101
XXVI	Observaciones experimentales de las pruebas realizadas para la identificación taxonómica de los grupos bacterianos degradadores de compuestos hidrocarbonados (muestra 4.2-10.1)	102
XXVII	Observación tinciones de Gram	103

XXVIII	Diagrama modificado de Cowans Steel, para identificación de bacterias heterótrofas	104
XXIX	Distribución de Mc Crady (para tres réplicas por dilución)	107

Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida.

Detrás de cada logro, viene otro desafío

Si extrañas lo que hacías, vuelve a hacerlo.

Sigue, nunca desfallezcas aunque todos esperen que abandones.

Mas nunca te permitas no creer en tus sueños; la fe y la esperanza son el

alma del corazón.

LISTA DE SÍMBOLOS

PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
g	Gramos
EPA	Agencia de protección ambiental de Estados Unidos.
Bbls/día	Flujo volumétrico de crudo expresado en barriles por día.
BTX	Benceno, tolueno y xileno.
C_nH_{2n-6}	Hidrocarburos aromáticos.
ml	Mililitros.
Ppm	Partes por millón.
Rpm	Revoluciones por minuto.
API	Medida de densidad que describe que tan pesado o liviano es el petróleo comparándolo con el agua.
C_nH_{2n+2}	Hidrocarburos metánicos o saturados normales (alcanos pertenecientes a la serie parafínica).
C_nH_{2n}	Hidrocarburos pertenecientes a la serie olefínica, alquenos.
ctS	Unidad física de la viscosidad cinemática en el sistema métrico. Centistokes
F	Grados Fahrenheit.
°C	Grados Celsius.
%	Porcentaje.
ρ	Densidad en g/ml.
Kcal	Unidad de energía térmica.
kg	Unidad básica de masa del sistema internacional de unidades (SI).

GLOSARIO

Aerobio	Proceso bioquímico o condición ambiental que sucede en presencia de oxígeno.
Almidón	Polisacárido que constituye un carbohidrato digestible.
Aguas freáticas	Agua contenida en reservorios subterráneos naturales.
Bacterias autótrofas	Bacterias que no necesitan nitrógeno ni carbono orgánico para su desarrollo, se nutren por si solas.
Bacterias hidrocarburoolíticas	Poblaciones bacterianas capaces de desarrollarse en medios de cultivo con diversos hidrocarburos como única fuente de carbono y energía.

Bioaumento	Aceleración de los procesos biológicos a través de la inoculación de bacterias seleccionadas y preparadas para el proceso.
Biodisponibilidad	Disponibilidad de un compuesto para su biodegradación.
Celulosa	Polisacárido compuesto exclusivamente de moléculas de glucosa.
Compuestos persistentes	Compuestos que se degradan muy lentamente.
Compuestos recalcitrantes	Compuestos que resisten la degradación.
Consorcio microbiano	Es un grupo de diferentes especies de microorganismos que actúan entre sí.

Desecho

Cualquier materia líquida, sólida, gaseosa o radioactiva que es descargada, emitida depositada, enterrada o diluida en volúmenes tales que puedan, tarde o temprano, producir alteraciones en el ambiente

Edafon

Conjunto de organismos vivientes del suelo, es decir la flora y fauna característica de un determinado suelo.

Exógeno

Dicho de un órgano: Que se forma en el exterior de otro, como las esporas de ciertos hongos.

Frotis

Se denomina frotis a la extensión que se realiza sobre un portaobjetos de una muestra o cultivo con objeto de separar lo más posible los microorganismos, ya que si aparecen agrupados en la preparación es muy difícil obtener una imagen clara y nítida.

Lípidos

Conjunto de moléculas orgánicas, la mayoría biomoléculas, compuestas principalmente por carbono e hidrógeno y en menor medida de oxígeno, aunque también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno, que tienen como característica principal el ser hidrofóbicas o insolubles en agua y sí en disolventes orgánicos.

Lixiviación

Proceso de lavado del suelo por la filtración del agua.

Mesófilo

Un organismo es mesófilo cuando tiene una temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 20°C y 45°C. La temperatura mínima se encuentra en el rango de 15°C a 20°C y la temperatura máxima en torno a 45°C.

Percolación

Flujo de un líquido a través de un medio poroso no saturado, por ejemplo de agua en el suelo, bajo la acción de la gravedad.

PH	Valor que representa convencionalmente la concentración de iones de hidrógeno de una disolución acuosa.
Pluma de hidrocarburos	Sucede cuando el hidrocarburo percola a través del suelo, y se acumula sobre el agua subterránea, ya que flota sobre ella.
Riesgo	Se define como la probabilidad que una sustancia o situación Produzca un efecto adverso para algún elemento sensible, a lo Humano o ecológico y/o económico, bajo determinadas condiciones de contacto.
Rizosfera	Región del suelo inmediata a la raíz de vegetales superiores.
Taxonomía	Término que se refiere a la clasificación o identificación de especies.
Turbidez	La turbidez se toma como una medida de crecimiento microbiano indirecto. Debido a que constituye una propiedad óptica del agua que causa la dispersión de la luz en vez de transmitirla.

Vertedero

Lugar adonde o por donde se vierten desechos.

Zooplancton

Fracción del plancton compuesta por organismos unicelulares pertenecientes a casi todos los grandes grupos animales, tanto adultos como larvas, que no siendo capaces de producir su propio alimento, dependen de la ingestión de otros organismos.

Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida.

Detrás de cada logro, viene otro desafío

Si extrañas lo que hacías, vuelve a hacerlo.

Sigue, nunca desfallezcas aunque todos esperen que abandones.

Mas nunca te permitas no creer en tus sueños; la fe y la esperanza son el

alma del corazón.

RESUMEN

La biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, consiste básicamente en estimular las capacidades degradadoras de los microorganismos indígenas del suelo, con la finalidad de mineralizar los contaminantes, o bien convertirlos en especies químicas menos tóxicas.

Es así como el proceso de transformación de compuestos orgánicos en el ambiente está influenciado por un número de factores que se pueden agrupar en aquellos que afectan el crecimiento y metabolismo de los microorganismos y aquellos que afectan al compuesto en sí mismo.

La biodegradación de los hidrocarburos también está asociada con el metabolismo y crecimiento microbiano, y por lo tanto cualquiera de los factores que afectan al crecimiento microbiano puede influenciar la degradación; si algunos de estos factores no son suficientemente planificados el procedimiento de remediación resulta una pérdida de tiempo, esfuerzo y dinero.

Por lo que el propósito principal del trabajo de investigación fue identificar las principales especies bacterianas hidrocarburohíticas provenientes del suelo contaminado, utilizando los residuos hidrocarbonados del suelo como única fuente de carbono y energía.

Las cepas mencionadas fueron aisladas a partir de muestras de suelo contaminado provenientes del área norte del país. Este suelo ha sido sometido a derrames de residuos generados por la industria hidrocarburífera en las cercanías de la localidad.

Por las características estudiadas del crudo del área norte dicho residuo contiene un alto contenido de hidrocarburos de petróleo y sales.

Las especies identificadas ya han sido aisladas previamente por otros autores, a partir de sitios contaminados y reportadas por su capacidad de degradar una amplia variedad de compuestos orgánicos. Se utilizaron técnicas microbiológicas para identificar, cultivar y aislar las cepas bacterianas.

Para diseñar el proceso de remediación utilizando los microorganismos nativos del suelo contaminado, se realizó análisis fisicoquímico de las principales características del suelo contaminado contra una muestra de suelo no contaminado proveniente de la misma región. Este análisis se utilizó como base para diseñar una propuesta viable al tratamiento de biorremediación aplicable al área en estudio.

Asimismo, se monitoreó la evolución de la población bacteriana durante un período de cuatro semanas como indicador de crecimiento y desarrollo potencial del consorcio microbiano empleando la técnica del número más probable.

Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida.

Detrás de cada logro, viene otro desafío

Si extrañas lo que hacías, vuelve a hacerlo.

Sigue, nunca desfallezcas aunque todos esperen que abandones.

Mas nunca te permitas no creer en tus sueños; la fe y la esperanza son el
alma del corazón.

OBJETIVOS

GENERAL

Identificar un consorcio microbiano para la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos.

ESPECÍFICOS:

1. Identificar los tipos de microorganismos degradadores de hidrocarburos presentes en una muestra de suelo contaminado.
2. Aislar cepas bacterianas con capacidad degradadora de crudo a partir del suelo proveniente de las áreas de extracción.
3. Determinar el potencial degradador a partir de la evolución de la población bacteriana.

Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida.

Detrás de cada logro, viene otro desafío

Si extrañas lo que hacías, vuelve a hacerlo.

Sigue, nunca desfallezcas aunque todos esperen que abandones.

Mas nunca te permitas no creer en tus sueños; la fe y la esperanza son el
alma del corazón.

INTRODUCCIÓN

Debido a que en estamos sujetos a una serie de flujos, tanto energéticos como de materia, igual que en un proceso industrial. La tierra actúa como receptor de todos esos flujos, convirtiéndose en fuente y vertedero de materiales, como también de reciclaje; ya que las materias primas provienen de la tierra, los desechos van a ella, y se degradan naturalmente también ahí. Sin embargo, estas capacidades del planeta son finitas, y en la actualidad están siendo sobreexplotadas por el ser humano.

Solo la industria petrolera a nivel mundial registra un volumen aproximado de derrame de crudo que va de los 1.7 a 8.8 millones de toneladas métricas al año. Los países productores de hidrocarburos en América Latina, principalmente Venezuela, Brasil, México, Argentina y Ecuador presentan las más severas contaminaciones a causa de la extracción y manejo del petróleo.

En Guatemala la actividad petrolera se inicia a finales de los años 30, en las regiones de la Libertad, Chinajá y Río la Pasión. En la actualidad se producen un promedio de 19,000 Bbls/día. El 80% de la producción de crudo se exporta, mientras el resto se consume internamente para la producción de asfalto para el consumo local. En el país actualmente operan 4 contratos otorgados por el Ministerio de Energía y Minas. La explotación de crudo se realiza principalmente en los departamentos de Petén y Alta Verapaz.

Al analizar la actividad petrolera actual del país, es vital considerar la producción de crudo así como la condición de los suelos cercanos al área de explotación debido a que los mismos contienen gran cantidad de microorganismos que pueden incluir un número de bacterias y hongos capaces de utilizar hidrocarburos como fuente de alimento, dicho número representa el uno por ciento (1%) de la población total de aproximadamente 10^4 a 10^6 células existentes por gramo de suelo. Cabe señalar que los suelos contaminados con hidrocarburos contienen más microorganismos que los suelos no contaminados, pero su diversidad microbiana es más reducida.

En todo el mundo se aplican diversas técnicas para contrarrestar el efecto contaminante derivado de la actividad petrolera. Existen y se aplican métodos físicos, químicos y biológicos para el tratamiento de los residuos, generalmente los dos primeros procesos representan un costo muy elevado para considerarse como una alternativa a implementar debido a las condiciones, nivel y tipo de crudo que se produce en el país dichos costos sobrepasan el valor percibido por la producción de hidrocarburos. Mientras que estudios realizados demuestran que la naturaleza misma posee la capacidad de subsanar incluso los peores daños ambientales ocasionados por derrames de hidrocarburos en el suelo, para ello emplea su capacidad de autoregeneración, siempre y cuando esta tenga tiempo para hacerlo. Por lo mismo muchas veces deben transcurrir varias decenas de años hasta que el crudo se haya descompuesto totalmente. Afortunadamente la biotecnología ha permitido el desarrollo de diversas estrategias que pueden ser utilizadas con el fin de restaurar el suelo y la calidad ambiental, de acuerdo con las necesidades y dimensiones del problema a solucionar.

En el presente trabajo se diseña un sistema productor del inóculo rico en microorganismos degradadores de hidrocarburos para su distribución a los sitios de uso final. Dicho sistema productivo se hace necesario debido a las dificultades que se presentan para producirlo *in situ*. También presenta la ventaja de poder tenerlo almacenado listo para su uso en el momento adecuado, constituyendo así un proceso de obtención de microorganismos degradadores de hidrocarburos para utilizar en las granjas de tratamiento.

Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida.

Detrás de cada logro, viene otro desafío

Si extrañas lo que hacías, vuelve a hacerlo.

Sigue, nunca desfallezcas aunque todos esperen que abandones.

Mas nunca te permitas no creer en tus sueños; la fe y la esperanza son el
alma del corazón.

1. ANTECEDENTES

Las técnicas de remediación biológicas emplean procesos naturales para eliminar sustancias químicas dañinas del medio ambiente. La biorremediación consiste en emplear microorganismos y manipular sus actividades metabólicas, para eliminar los contaminantes o al menos convertirlos en especies químicas menos agresivas, minimizando el compromiso ambiental y facilitando la continuidad de los procesos biodegradativos enzimáticos responsables de la acción auto depurativa del ambiente. En el proceso los microorganismos participantes son principalmente bacterias y en menor medida hongos nativos (filamentosos y levaduras) y algas. Estos son capaces de degradar una amplia variedad de sustratos orgánicos que además se encuentran presentes en casi todas las superficies materiales, debido a que muchos contaminantes hidrocarbonados tienen estructuras similares a las presentes en los compuestos naturales y es por ello que son fácilmente degradables por los microorganismos del suelo y del agua, a estos microorganismos que viven en el suelo y las aguas superficiales les gusta comer ciertas sustancias químicas dañinas como las que se encuentran en derrames de gasolina y petróleo. Cuando esta digestión es total, estas sustancias químicas se convierten en agua y gases como el CO₂. (Referencia 5, págs. 311-313).

Para que los microorganismos aeróbicos puedan eliminar las sustancias químicas dañinas, el suelo debe tener la temperatura, los nutrientes y la cantidad de oxígeno apropiados. Estas condiciones permiten que crezcan y se multipliquen y consuman más sustancias químicas. Cuando las condiciones no son las adecuadas, los microorganismos crecen muy despacio o mueren. Incluso pueden crear sustancias químicas más dañinas; para que esto no ocurra se deben controlar las condiciones del sitio. (Referencia 5: págs. 311-313).

La biotecnología permite el desarrollo de diversas estrategias que pueden ser utilizadas, con el fin de restaurar el suelo y la calidad ambiental de acuerdo con las necesidades y dimensiones del problema a solucionar, pero en general no hay una fórmula secreta que garantice el éxito de la biorremediación, es por ello que la propuesta parte desde el diseño y la implementación de un proceso productivo a partir de la formulación de una población microbiana exógena multiplicada in Vitro para aumentar la velocidad natural de degradación del contaminante, estos microorganismos se obtendrán de diversos medios de donde se puedan aislar los principales consorcios bacterianos así como levaduras y hongos específicos degradadores de los tres tipos de hidrocarburos que se extraen en el país. (Referencia 1: págs. 3-5)

Al establecer los consorcios definidos se propone una combinación de cepas aisladas con capacidades degradativas conocidas que son complementarias entre sí, partiendo del principio que son morfotipos ambientales, los que inmediatamente se acabe su fuente de alimento bajan a un número que no cause disturbios en el ambiente, favoreciendo con esta formulación la continuidad y eficiencia del proceso de biorremediación utilizado actualmente por las industrias petroleras que operan en el país, así como la calidad de vida de las poblaciones y fuentes naturales cercanas al área de explotación. (Referencia 1: págs. 3-10)

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Suelo

2.1.1 Composición del Suelo

El suelo se define como un sistema natural desarrollado a partir de una mezcla de minerales y restos orgánicos bajo la influencia del clima y del medio biológico; se diferencia en horizontes y suministra, en parte, los nutrientes requerido por las plantas, al contener cantidades apropiadas de aire y de agua. (Referencia 3: págs. 3-5)

El suelo tiene cuatro componentes importantes; minerales, materia orgánica, aire y agua. La fase sólida (mineral y orgánica) ocupa generalmente el 50% de su volumen total. El resto lo ocupan la fase líquida (agua) y la fase gaseosa (aire), las que mantienen una proporción complementaria al llenar los poros que se originan entre los agregados y las partículas de la fase sólida. La proporción de la materia orgánica dentro de la fase sólida varía entre los suelos, es por ello que el contenido de la materia orgánica disminuye en forma variable con la profundidad del suelo. Es importante mencionar que la composición de los subsuelos varía con respecto a la de los suelos.

El nivel de materia orgánica disminuye en ellos y generalmente son también más compactos y tienen mayor cantidad de poros pequeños. (Referencia 14: págs. 141-143).

Figura 1 Composición del suelo



Fuente: (Referencia 14: pág. 142)

En la composición química de los primeros 16 km de la corteza terrestre o litosfera, denominada Sial por la predominancia de los elementos silicio y aluminio, constituyen junto con el oxígeno y hierro, el 87% de su volumen total; los siguen en importancia el Ca, Mg, Na y K; solo estos 8 elementos químicos sobrepasan el 1% de participación, y en menor proporción se encuentran el Ti, P, Mn, Cl y C. La segunda capa de la corteza terrestre de aproximadamente 48 km se caracteriza por la predominancia de Si y Mg y se denomina Sima. Ochenta elementos químicos constituyen la totalidad de las rocas madres y se presentan aproximadamente 2000 minerales de los cuales sólo una docena son predominantes en la capa superficial de la corteza terrestre, esta composición varía bastante con el tipo de roca y con su origen. (Referencia 3: págs. 11-13).

Los minerales del suelo se clasifican en primarios y secundarios. Los primarios se forman a altas temperaturas y son propios de rocas ígneas o metamórficas. Los secundarios se forman a bajas temperaturas y a través de los procesos de meteorización y son propios de las rocas expuestas en la superficie. (Referencia 3: págs. 11-13).

2.1.2 Análisis de la composición química y mineralógica de los suelos

2.1.2.1 Análisis químico elemental

El análisis cualitativo y cuantitativo de la composición de los suelos es de gran importancia para su descripción y caracterización, así como para la comprensión de sus propiedades. El análisis elemental nos proporciona la composición química del suelo por elementos y se practica con la finalidad de caracterizar químicamente una roca o suelo, para calcular las cantidades totales de nutrientes en suelos, así como para determinaciones y balances sobre lixiviación y percolación de elementos en el suelo. Mientras que el análisis mineralógico informa sobre los diferentes minerales que componen cada fracción del suelo. (Referencia 8: págs. 56-58).

2.1.3

Importancia de la Biodiversidad en el suelo

2.1.3.1 Componentes orgánicos de la fase sólida del suelo

La materia orgánica está constituida por los compuestos de origen biológico que presenta el suelo. En el horizonte A el edafón constituye entre el 10-15% de la materia orgánica. El humus está compuesto por los restos postmortales vegetales y animales que se encuentran en el suelo y que están sometidos de forma constante a procesos de descomposición, transformación y resíntesis. (Referencia 8: págs. 58-63)

La fuente originaria de la materia orgánica y del humus son los restos animales y especialmente vegetales que se depositan en el suelo. Cada uno de los componentes de la vegetación tiene una composición química específica. Estos residuos son objeto de su degradación o descomposición hasta los componentes elementales de las proteínas, carbohidratos y otros, en el proceso de la mineralización. (Referencia 8: págs. 58-63)

Los productos resultantes pueden ser objeto de nuevos procesos de resíntesis y polimerización dando lugar a nuevos agregados químicos que reciben el nombre de ácidos húmicos de características y propiedades específicas adquiridas mediante la bioquímica del proceso de mineralización. (Referencia 8: págs. 58-63)

Las transformaciones más importantes en los procesos de la mineralización y la humidificación son de naturaleza bioquímica. Después de la destrucción mecánica y física de los restos vegetales y animales se produce el ataque por microorganismos que a base de sus jugos digestivos y encimas que llevan a la destrucción de los compuestos orgánicos y a la liberación de minerales. (Referencia 8: págs. 58-63)

Los siguientes grupos de microorganismos participan en el proceso de mineralización: (Referencia 3: págs. 21-22)

MICROFLORA

- **Bacterias:**

Micrococcus sp.; Bacterium sp.; Bacillus sp.; Azotobacter sp.; Clostridium sp.

Actinomicetes: Streptomicetes; Nocardia sp.

- **Hongos:**

Ascomicetes; Aspergillus sp.; Penicillium sp.; Hifomicetes: Dematiacem sp.;

Fusarium sp.; Cladosporium sp.; Hormodendrum sp.; Neospura sp.;

Bacidiomicetes.

MICROFAUNA

- Rizópodos, flagelados, ciliados.

MACROFAUNA

- Nematodos, lombrices, hormigas, termitas, colémbolos. (Referencia 8: págs. 58-63).

2.1.4 Propiedades del suelo

Por sus características, el suelo cumple un rol muy importante y esencial para el sustento de la vida en todo el planeta. Es por ello que la comisión para la comunidad Europea las define de la siguiente forma:

- Fuente de alimentos para la producción de biomasa
- Actúa como medio filtrante y buffer
- Hábitat de miles de organismos
- Escenario donde ocurren los ciclos biogeoquímicos
- Fuente de materia prima indispensable para el ser humano como los minerales
- Lugar donde se realizan la mayoría de las actividades humanas como por ejemplo la agricultura y las actividades forestales

Entre estas propiedades es importante resaltar la capacidad de los suelos de actuar como tampón y de servir de acopio de materiales, ambas características dependen fuertemente del contenido de materia orgánica presente, correspondiendo a la propiedad de “vertedero”. Ya que cuando la capacidad de almacenar del suelo, se ve sobrepasada, ocurren muchos de los desastres naturales; en particular cuando se excede la dosificación de reactivos o derrames que impiden el correcto actuar de la capacidad tampón que presenta el suelo, convirtiéndose en un riesgo para la salud no solo de las personas, sino también de todos los organismos que dependen y viven en él. . (Referencia 14: págs. 142-146).

La materia orgánica es uno de los componentes centrales del suelo y juega un rol muy importante, pues se encarga de mantener las funciones del suelo, en particular la capacidad de resistir a la erosión y de mantener la fertilidad del suelo. Además de asegurar la capacidad tampón mencionada y de adhesión que posee el suelo, primordial para limitar la difusión de contaminantes.

El suelo además es un medio rico en vida, con una gran diversidad de microorganismos que viven en él, siendo esto central para todas las funciones naturales que posee. La riqueza en diversidad otorga la estructura y fertilidad del suelo, incluida la producción de alimentos. (Referencia 14: págs. 142-146).

A pesar de haber sido considerado por muchos años un recurso infinitamente renovable, por su apariencia sana, el suelo superior es netamente un recurso No Renovable, y actualmente posee altas tasas de degradación y tasas extremadamente lentas de regeneración debida principalmente a la acción humana. . (Referencia 14: págs. 142-146)

2.2 Petróleo

2.2.1 Etimología

La palabra petróleo se emplea para designar cada uno de los compuestos químicos líquidos resultantes de la combinación del carbono (C) con el hidrógeno (H). (Referencia 11: págs. 201-223)

El crudo de petróleo se caracteriza por ser un líquido viscoso que por transmisión de la luz varía desde un color amarillo pálido, tonos de rojo y marrón hasta llegar a negro. Por reflexión de la luz pueden aparecer verdes, amarillos con tonos de azul, rojo, marrón o negro. (Referencia 11: págs. 201-223).

Los crudos pesados y extrapesados son negros casi en su totalidad. En general el petróleo es una mezcla de hidrocarburos, compuestos que contienen en su estructura molecular carbono e hidrógeno principalmente. (Referencia 11: págs. 201-223)

El número de átomos de carbono y la forma en que están colocados dentro de las moléculas de los diferentes compuestos proporciona al petróleo diferentes propiedades físicas y químicas. Así tenemos que los hidrocarburos compuestos por uno a cuatro átomos de carbono son gaseosos, los que contienen de 5 a 20 son líquidos, y los de más de 20 son sólidos a la temperatura ambiente. (Referencia 2: págs. 270)

El petróleo crudo varía mucho en su composición, lo cual depende del tipo de yacimiento de donde provenga, pero en promedio podemos considerar que contiene entre 83 y 86% de carbono y entre 11 y 13% de hidrógeno. (Referencia 2: págs. 270)

Mientras mayor sea el contenido de carbón en relación al del hidrógeno, mayor es la cantidad de productos pesados que tiene el crudo. Esto depende de la antigüedad y de algunas características de los yacimientos. No obstante, se ha comprobado que entre más viejos son, tienen más hidrocarburos gaseosos y sólidos y menos líquidos entran en su composición. Algunos crudos contienen compuestos hasta de 30 a 40 átomos de carbono. (Referencia 2: págs. 271).

2.2.2 Formación de los hidrocarburos del petróleo

Muchos geólogos ven el Petróleo crudo, el carbón y el gas natural, como el resultado de compresión y calentamiento de vegetación milenaria durante escalas de tiempo geológicas. Acorde a esta teoría el Petróleo crudo está formado de residuos de animales marinos prehistóricos y plantas terrestres. (Referencia 2: págs. 270)

Durante muchos siglos esta materia orgánica se mezcló con lodo y quedó enterrada debajo de capas sedimentarias. El resultado de los altos niveles de calor y presión causaron que estos restos sufrieran una primera metamorfosis convirtiéndose en una mezcla parecida al lodo y luego en hidrocarburos gaseosos los cuales emigraron a través de capas rocosas adyacentes hasta quedar atrapados en rocas porosas llamadas reservas, formando un campo petrolero en el cual los hidrocarburos pueden ser extraídos a través de la perforación y el bombeo. (Referencia 2: págs. 271-272)

Mediante varios análisis se sabe que el petróleo, con toda la diversidad de su composición representa una composición de dos grupos de compuestos únicos por su conformación. (Referencia 2: págs. 271-272).

Al primer grupo pertenecen los compuestos con estructura heredada de las moléculas de la materia orgánica inicial que experimentaron solo pequeñas transformaciones. El segundo grupo lo integran los compuestos formados como resultado de profundos e irreversibles procesos de transformación de la materia orgánica, lo que dio lugar a la creación sobre esta base de compuestos ajenos a sistemas biológicos. A estos últimos pertenecen principalmente los cicloalcanos, árenos y los cicloalcanos árenos mixtos. (Referencia 2: págs. 271-272).

La composición general del crudo extraído en Guatemala es de la siguiente forma:

1. Contenido de Carbono 83 – 87% en peso
2. Contenido de Hidrogeno 04 – 14% en peso
3. Impurezas 0.5 – 5% en peso
 - S, N₂ y O₂
 - Metales (Fe, Cd y Mn).

2.2.3 Propiedades y características del crudo extraído por región de explotación

2.2.3.1 Características del petróleo crudo campo Xan (contrato 2-85)

Tabla I Características del petróleo extraído campo Xan

Contenido de Azufre (%)	6.18
Gravedad (API)	16
Calor de Combustión (Kcal/kg)	9997
Viscosidad Cinemática a 100°F (cts.)	26.65

Fuente: (Referencia 6: págs. 3-5)

2.2.3.2 Características del petróleo crudo del campo Rubelsalto (contrato 1-85)

Tabla II Características del petróleo extraído campo Rubelsalto

Contenido de Azufre (%)	3.2
Gravedad (API)	23.6
Calor de Combustión (Kcal/kg)	9850
Viscosidad Cinemática a 100°F (cSt)	26.65

Fuente: (Referencia 6: págs. 3-5)

2.2.3.3 Características del petróleo crudo del campo Chocop (contrato 1-91).

Tabla III Características del petróleo extraído campo Chocop

Contenido de Azufre (%)	7.03
Gravedad (API)	13.7
Calor de Combustión (Kcal/kg)	10167
Viscosidad Cinemática a 100°F (cSt)	423

Fuente: (Referencia 6: págs. 3-5)

2.2.3 Clasificación del crudo de petróleo

En la industria petrolera, la palabra **hidrocarburos** abarca estos compuestos en sus cuatro estados: gaseoso, líquido, semisólido y sólido. Es importante señalar que en la naturaleza existen acumulaciones que son puro gas. (Referencia 16: págs. 34-45)

El gas puede ser seco o húmedo, según la impregnación de hidrocarburos líquidos que contenga. En estado líquido se presentan los petróleos livianos, medianos y pesados. Sin embargo, algunos petróleos pesados y extrapesados son líquidos o semilíquidos en el yacimiento, debido a la temperatura. Estos petróleos tienden a ser semisólidos, o sea de muy poca fluidez o alta viscosidad en la superficie. (Referencia 16: págs. 34-45)

Existen dos clasificaciones que son las más comunes utilizadas para el petróleo:

2.2.4.1 con base a su estructura molecular

2.2.4.2 con base a su grado API

2.2.4.1 Clasificación del Crudo con base a su estructura molecular

La clasificación con base a su estructura molecular es de la siguiente forma:

- 2.2.4.1.1 Petróleos de base parafínica
- 2.2.4.1.2 Petróleos de base naftenica (cicloparafinas)
- 2.2.4.1.3 Petróleos de base bencénica
- 2.2.4.1.4 Petróleos de base mixta.

2.2.4.2 Con base a su grado API

Esta clasificación se basa en la densidad API establecida para los crudos del petróleo. (Referencia 16: págs. 34-45)

Tabla IV. Clasificación del Crudo en base a su grado API

Grado API	Tipo de petróleo	Ubicación, campamento
Hasta 21°	Pesado	Xan, Chocop, Caribe
>21° - 28°	Mediano	Tierra Blanca, Rubelsalto
>28° - 49°	Liviano	Chinajá, Yalpemech, Las Casas

Fuente: (Referencia 6: págs. 3-5)

2.2.5

Formación de los Hidrocarburos del Petróleo

Todos los compuestos orgánicos se derivan de un grupo de compuestos conocidos como hidrocarburos debido a que están formados solo por hidrogeno y carbono. Según su estructura, los hidrocarburos se dividen en dos clases principales: alifáticos y aromáticos. (Referencia 16: págs. 34-45).

Los hidrocarburos alifáticos no contienen al grupo benceno, o el anillo bencénico, en tanto que los hidrocarburos aromáticos contienen uno o más anillos bencénicos. En Guatemala el crudo extraído varía según la región donde se extrae. (Referencia 16: págs. 34-45).

2.2.5.1 Hidrocarburos alifáticos

2.2.5.1.1 Serie parafínica

Los alcanos o hidrocarburos saturados normales, también conocidos como hidrocarburos metánicos tienen la fórmula general C_nH_{2n+2} . La principal característica de las moléculas de los hidrocarburos alcanos es que solo presentan enlaces covalentes sencillos. (Referencia 16: págs. 34-45).

Los alcanos contienen el número máximo de átomos de hidrógeno que pueden unirse con la cantidad de átomos de carbono presentes. (Referencia 4)

En la composición de los alcanos están representados con mayor amplitud los compuestos de estructura normal y monometilsustituídos con diferente posición del grupo metílico en la cadena. (Referencia 16: págs. 34-45)

Su contenido total en petróleos de diversos tipos varía dentro de amplios límites, desde fracciones de uno por ciento hasta 30% y más. (Referencia 16: págs. 34-45)

Cabe señalar que la fuente principal y básica de formación de los alcanos, son los ácidos grasos: componentes principales de los lípidos de la vegetación marina y del zooplancton. (Referencia 16. págs. 34-45)

2.2.5.1.1.1 Alcanos ramificados

Estos compuestos están representados en los petróleos con relativa amplitud, sin embargo entre ellos están bien estudiados los de bajo peso molecular. (Referencia 16: págs. 34-45)

2.2.5.1.2 Naftenos

Los cicloalcanos o naftenos son derivados de ciclo pentano y ciclohexano, llamados también cicloparafinas y pertenecen a la clase más compleja por su estructura química de hidrocarburos del petróleo, dándole a este sus rasgos característicos que determinan el lugar del petróleo entre otros minerales de la naturaleza. (Referencia 16: págs. 34-45)

Debe notarse la ausencia de dos átomos de hidrógeno entre la fórmula general C_nH_{2n+2} (serie parafínica) y la fórmula C_nH_{2n} correspondiente a los derivados.

2.2.5.1.3 Serie olefínica C_nH_{2n}

También conocidos como alquenos, contienen por lo menos un doble enlace carbono-carbono, por lo que este tipo de hidrocarburos tienen relativamente poca saturación. Se asemejan a los parafínicos pero tienen dos átomos de carbono ligados por una unión doble. Se presentan en los tres estados. (Referencia 16: págs. 34-45)

2.2.5.1.4 Aromáticos C_nH_{2n-6}

Los aromáticos se encuentran en pequeñas cantidades en casi todos los crudos. El benceno, el tolueno y el xileno (BTX) se pueden extraer en las refinerías para utilizarlos como insumos de procesos petroquímicos o como solventes. El contenido total de estos hidrocarburos en diferentes petróleos oscila dentro de unos límites bastante amplios, constituyendo en promedio, de 10-20% en masa. (Referencia 16: págs. 34-45).

Esta clase de hidrocarburos está representada, en los petróleos por el benceno y sus homólogos, así como por los derivados de los compuestos bi y policíclicos. (Referencia 16: págs. 34-45)

Los petróleos contienen también hidrocarburos con estructuras híbridas que poseen no solo ciclos aromáticos y cadenas alifáticas sino también ciclos de cicloalcanos. Los árenos del petróleo resultan mejor estudiados que los hidrocarburos de otras clases. (Referencia 16: págs. 34-45).

En comparación con los alcanos y los cicloalcanos los árenos poseen una densidad y un índice de refracción mucho más alto, de igual forma los campos de fuerza de sus moléculas y el volumen o el área de la superficie de las moléculas son mucho más intensos que los de los hidrocarburos saturados.

Esta es la razón que los árenos se adsorben mejor por los adsorbentes polares y se disuelven selectivamente en la mayoría de los disolventes polares. (Referencia 16: págs. 34-45)

Una excepción la representan tan solo los compuestos alifáticos y alicíclicos polifluorados que disuelven mejor los hidrocarburos saturados que los aromáticos. (Referencia 16: págs. 34-45).

2.2.5.2 Clasificación en base a estructura molecular del crudo extraído en Guatemala por región de explotación.

Tabla V Clasificación del crudo extraído en Guatemala con base a su estructura molecular

Tipo de Crudo	Región
Parafinico	Franja transversal del norte y la cuenca Petén Sur
Naftenico	Arco la Libertad
Densénico o Asfaltenico	Cuenca Petén Norte

Fuente: (Referencia 6: págs. 3-5)

2.2.6 Exploración y explotación petrolera en Guatemala

2.2.6.1 Reseña histórica

La exploración Petrolera en Guatemala se ha llevado a cabo por alrededor de 60 años y a la fecha se han perforado 139 pozos. (Referencia 6: págs. 3-5)

La producción actual es aproximadamente de 19,000 Bbls/día provenientes de las cuencas petroleras Peten Norte y Peten Sur, el petróleo es transportado por medio de un oleoducto el cual proviene de Rubelsanto en el norte de del departamento de Alta Verapaz y de Xan en el norte del Peten, ambos se interceptan en la estación de bombeo Raxruja siguiendo en una sola línea con tubería de diámetro de 12" , 10", el crudo es transportado a la Terminal petrolera Piedras Negras en Santo Tomas de Castilla, Departamento de Izabal, donde el crudo es exportado para su refinamiento. (Referencia 6: págs. 3-5)

Los primeros años, la actividad petrolera se inicia a fines de los años 30, cuando se realizó un programa foto geológico en las regiones de La Libertad, Chinajá y Río La Pasión. En 1944 se iniciaron estudios geológicos los cuales involucraban mapeo superficial, aeromagnetometria y levantamientos gravimétricos. Llegando a su fin en 1949 por cambios en la Legislación Petrolera y reiniciándose en 1955. En este año se emitió la nueva Legislación Petrolera denominada "Código Petrolero" el cual permitía concesiones por 400,000 hectáreas, en un solo bloque o dividida en no más de 10 partes. (Referencia 6: págs. 3-5)

En 1956 se reinician trabajos de mapeo superficial, continuando en 1957 con levantamientos gravimétricos y aeromagnéticos en las áreas de Peten, Izabal y Amatique. A esta época también se adquirieron los primeros registros sísmicos e interpretaciones estratigráficas. Obteniendo así 44 concesiones para finales de ese año. (Referencia 6: págs. 3-5).

El primer pozo exploratorio “Castillo Armas-1” fue perforado en 1958, este fue el principio de 10 pozos exploratorios más perforados entre 1958 y 1962, en 1959 se realizó la perforación de 3 pozos. (Referencia 6: págs. 3-5).

En 1960 se completaron dos pozos: “Chinaja-1” perforado en 1959, en el cual se encontraron trazas en los carbonatos del Cobán debajo de los 4000 pies y la prueba de DST a 10,005 pies probó 60 pies de crudo ácido de 36.5 grados API, debido a problemas de H₂S el pozo se perdió, se realizó una desviación que terminó como un pozo seco. El segundo pozo fue “San Román-1” que también resultó seco, en 1961 la exploración declina perforándose los pozos “El Canchacan-1 y la Pita-1. (Referencia 6: págs. 3-5).

La segunda fase se inició en 1964, cuando se perforó una prueba estratigráfica “San José-1” en la cuenca Pacífico, este pozo alcanzó 1730 pies y reportó buenos indicios de gas, se continuaron trabajos de investigación en la cuenca entre 1969 y 1971, en 1972 se perfora Petrel-1 en el flanco de una plataforma estructural, sin éxito; para 1974 los bloques del Pacífico fueron devueltos sin haberse realizado trabajos adicionales. (Referencia 6: págs. 3-5).

En 1967 un Decreto Gubernamental permitió que las áreas de los parques nacionales guatemaltecos fueran exploradas. Siendo los primeros trabajos realizados en el área de Rubelsalto. (Referencia 6: págs. 3-5)

En la estructura de Tortugas se exploró en búsqueda de azufre, encontrándose petróleo, dándose así el inicio a la etapa contemporánea de exploración petrolera. En 1975 se publicó el Decreto Gubernamental 96-75 “Ley de Régimen Petrolero de la Nación”, cambiándose la modalidad de concesiones a contratos de exploración y explotación. Bajo esta ley solo dos grupos quedaron trabajando para fines de 1976, Shenandoah (Shenandoah, SAGA y Basic) y Centram, en 1976 se perforó Xalbal-1.

Es así como en el 2006 se anuncia la formación de la Comisión Nacional Petrolera para controlar las operaciones petroleras guatemaltecas. Desde ese año más de 40 pozos han sido perforados en Guatemala y más de 12,600 Km. de registros sísmicos se han adquirido. (Referencia 6: págs. 3-5).

2.2.6.3

Producción petrolera.

En el período de 1976 y 1980 fueron perforados 7 pozos, incluyendo el descubrimiento del Campo Chinaja Oeste. Dos pozos se perforaron en esta estructura; el pozo 3, productor y el pozo 2 utilizado como observador de presión después de probar 7 zonas de agua salada. (Referencia 6: págs. 3-5)

En 1978 se inicia la construcción del oleoducto Rubelsalto- Santo Tomas, con el objetivo de transportar la producción de petróleo para su exportación iniciando las operaciones en enero de 1980, en el periodo de 1980-1985 se perforo y completo Yalpemech-1, en la prueba de acidificación produjo 1500 bis de petróleo por día, se perforaron 5 pozos que resultaron secos en el bloque BB, en los pozos de Caribe, San Diego, Yalpemech y Tierra Blanca se descubrieron hidrocarburos, sumándose a los de Chinaja Oeste, Tortugas y Rubelsanto los cuales se encuentran en la cuenca Petén Sur, durante ese período se realizaron trabajos sísmicos en el bloque E. (Referencia 6: págs. 3-5)

Por el auge exploratorio y los inicios de producción se instituye el Ministerio de Energía y Minas, el 1 de julio de 1983, promulgándose la nueva Ley de Hidrocarburos (decreto 109-83) y su Reglamento, actualmente vigente, en los inicios de los 80`s Texaco Exploration Guatemala Inc. Perfora 4 pozos exploratorios descubriéndose el campo Xan, posteriormente se suscribe el contrato 2-85 en la modalidad de operaciones petroleras de participación en la producción, contrato que derivado de la estimación de petróleo in situ de 400 millones de barriles, construyéndose posteriormente el oleoducto Xan-Raxruhá con 232 kilómetros de longitud.

De 1985 a 1995 se perforan pozos en las áreas de Caribe, Rubelsalto, Atzam, Yalpemech, actividades que son realizadas por las empresas Hispanoil, Basic Resources, Peten Petroleum, teniéndose producción y presencia de hidrocarburos en dichos pozos; de 1995 hasta el momento en lo relacionado a explotación se desarrolla con ímpetu el campo Xan, al perforarse 14 pozos de desarrollo, teniéndose bastante éxito mayormente en el año 2000 la modalidad de perforación horizontal en el cual se logran caudales de pozo de 4 veces más que una perforación convencional. (Referencia 6: págs. 3-5).

Actualmente existen 4 empresas que operan contratos de exploración y explotación de hidrocarburos: Perenco Guatemala Limited, Compañía General de Combustibles, Petro Latina Guatemala Corp., Petro Energy S. A., y alrededor de 27 empresas subcontratistas de servicios con larga experiencia en la industria petrolera nacional. (Referencia 6: págs. 3-5).

La producción de petróleo ha mantenido una tendencia creciente y ha alcanzado a la fecha un promedio de 25,000 barriles diarios, convirtiéndose hoy día en el cuarto producto tradicional de exportación nacional que genera divisas e impulsa la economía nacional. (Referencia 6: págs. 3-5).

2.3 Suelos contaminados

En síntesis, un suelo contaminado es aquel que representa una amenaza para la salud humana y el medio ambiente, debido a las sustancias presentes en o bajo el suelo, generalmente debido a un mal uso previo. Además se puede decir que un sitio contaminado es “aquel con presencia de componentes que no son atribuibles a la condición natural del sitio”. (Referencia 20: pág. 169)

La introducción de contaminantes o material exógeno al suelo puede traducirse en un daño o pérdida de algunas o varias de las funciones antes mencionadas, repercutiendo directamente en la calidad del suelo y su función. Además no solo perjudica al suelo, sino también puede tener implicancias en aguas superficiales y subterráneas al ser arrastrados los contaminantes de ese lugar ya sea por medio de lluvias o simple infiltración. (Referencia 20: pág. 169).

Además, la presencia de contaminantes por sobre ciertos niveles implica múltiples consecuencias negativas para la cadena alimenticia y por lo tanto para la salud humana. Existe también un efecto estético de la contaminación, más allá de la pérdida de capacidad de soporte al crecimiento vegetal, que impacta negativamente sobre el valor económico, debido a que el uso que se le dará a este suelo está restringido a la capacidad de éste, y si está contaminado, su calidad y por tanto capacidad, se ve disminuida. (Referencia 20: pág. 169)

La contaminación de suelos donde se desarrollan actividades industriales, agrícolas y humanas en general, es consecuencia directa de una inadecuada utilización del mismo. (Referencia 20: pág. 169).

2.3.1 Gestión ambiental en el sitio contaminado

La gestión de riesgo ambiental se basa en el estudio del riesgo debido a la presencia de contaminantes en el suelo. (Referencia 20: págs. 169)

Debido a las normativas de la limpieza de sitios contaminados en países desarrollados, se han producido una serie de metodologías, propuestas principalmente por la EPA, para la correcta caracterización y definición del problema, así como las posibles tecnologías aplicables para su remediación. Según los estatutos internacionales aplicables la gestión ambiental de un sitio incluye la recolección e interpretación de información histórica acerca de las actividades realizadas en ese lugar y de los posibles niveles de contaminantes químicos que puedan estar presentes en el sitio - Para realizar esta gestión se siguen principalmente dos pasos, la fase I, donde se evalúa la ocurrencia de contaminación histórica y una fase II donde la cantidad y extensión de contaminantes es determinada. (Referencia 20: págs. 169).

- Fase I: incluye una investigación histórica del sitio, que consiste en una recopilación histórica de los antecedentes del sitio, determinando las actividades realizadas en él, así como inspeccionar directamente el lugar. Luego de completar esta fase se puede definir si existen sustancias peligrosas en la propiedad y seguir con la fase II, o bien no es necesario seguir otra acción. (Referencia 20: págs. 169).
- Fase II: El propósito de esta fase es descubrir y entender cuáles son los contaminantes presentes en el sitio, dónde se encuentran específicamente y en qué niveles. Para esto se tiene una serie de metodologías analíticas, que evalúan la presencia de químicos, así como la forma como se obtienen las muestras que se desean evaluar.

La biodisponibilidad de un elemento en un suelo cualquiera, es una función compleja de diversos parámetros fisicoquímicos del suelo y de parámetros propios de los seres vivos presentes en el área, muchos de los cuales aún están siendo investigados, actualmente no existen aún modelos que permitan predecirla. (Referencia 20: págs. 169).

2.4 Suelos contaminados con hidrocarburos

Cuando ocurre un derrame de hidrocarburos sobre el suelo, el petróleo se mueve hacia las capas subyacentes del suelo, pudiendo alcanzar el nivel de las aguas subterráneas, y moverse en la dirección de estas, alcanzando zonas de algunos kilómetros aguas abajo, en la dirección de flujo de las aguas freáticas, formando lo que se denomina una pluma de hidrocarburos. (Referencia 15: págs. 1-8).

2.5 Relación entre los microorganismos propios del suelo y los microorganismos de un suelo contaminado por hidrocarburos

2.5.1 El suelo como hábitat microbiano

Los microorganismos presentes en el suelo son de sustancial importancia en cuanto a su nivel de fertilidad así como para la degradación de materias orgánicas y contaminantes en suelos y sedimentos. (Referencia 20: págs. 169)

Estos microorganismos juegan un papel indispensable en los ciclos biogeoquímicos, tanto del carbono, del nitrógeno como de muchos otros elementos. (Referencia 3: págs. 14-23).

El crecimiento microbiano más importante tiene lugar en la superficie de las partículas del suelo normalmente en la rizosfera, por lo que hasta un pequeño agregado de suelo contiene microambientes muy diferentes, lo que significa que existe la posibilidad de encontrar diferentes tipos de microorganismos. (Referencia 3: págs. 14-23).

El recuento de bacterias siempre es mayor en la rizosfera que en zonas del suelo donde no se encuentran raíces, debido a que las raíces secretan cantidades considerables de azúcares, aminoácidos, hormonas y vitaminas estimulando un crecimiento intenso de bacterias y hongos. Por lo que la abundancia y diversidad de microorganismos en el suelo, depende directamente del horizonte del suelo que se esté estudiando. Se estima que en un gramo de suelo se pueden encontrar hasta 600 millones de bacterias, correspondientes entre que varían desde los 4 mil hasta las 20 mil especies distintas, por cada gramo de suelo hay alrededor de 4 mil especies de microorganismos. (Referencia 3: págs. 14-23).

Normalmente en una porción de suelo se encuentran alrededor de 10^6 a 10^9 bacterias por gramo de suelo, encontrándose más bacterias Gram positivas que en otro hábitat, sin embargo predominan las Gram negativas en números absolutos. (Referencia 3: págs. 14-23).

2.5.1.1

Composición generalizada de bacterias en el suelo

Tabla VI Composición generalizada de bacterias en el suelo.

Especie	Porcentaje
Arthrobacter	5-60
Bacillus	7-67
Pseudomonas	3-15
Agrobacterium	1-20
Alcaligenes	1-20
Flavobacterium	1-20
Corynebacterium	2-12
Micrococcus	2-10
Staphylococcus	<5
Xanthomonas	<5
Mycobacterium	<5

Fuente: (Referencia 3: págs. 14-23)

2.5.1.2 Fijación biológica asimbiótica

Algunos microorganismos libres, asimbióticos, están capacitados para la fijación de nitrógeno. Son heterótrofos con respecto al carbono, necesitan para su desarrollo azúcares, celulosa o almidón, que encuentran en el suelo producido muchas veces por otros microorganismos. (Referencia 3: págs. 14-23).

2.6 Suelos contaminados y microorganismos

En suelos contaminados, las comunidades microbianas están regidas por aquellas bacterias capaces de subsistir a la toxicidad presente en el ambiente siendo capaces de utilizar al contaminante para crecer; en este sentido el contaminante produce una inestabilización en las comunidades ecológicas del suelo. (Referencia 3: págs. 14-23).

Es por ello que la diversidad de especies presentes en el suelo puede ser un indicador de la contaminación, es decir de la aparición de microorganismos resistentes a ésta en una comunidad, lo que constituye un indicador biológico de impacto. (Referencia 3: págs. 14-23).

Con base a estudios realizados sobre toxicidad se sabe que algunos grupos de microorganismos tienen la capacidad de ser más resistentes a contaminantes como sucede con las bacterias Gram positivas y negativas, en donde las bacterias Gram negativas son más resistentes que a las Gram positivas, en particular ante la presencia de metales. Por lo que la presencia de comunidades resistentes a metales implica serias consecuencias ecológicas, pues estas comunidades presentan bajas tasas de mineralización, su capacidad de biodegradación decrece así como su resistencia al frío. (Referencia 3: págs. 14-23).

Tabla VII Relación entre los microorganismos propios del suelo y los microorganismos de un suelo contaminado por hidrocarburos

Tipo de microorganismos	Fuente de energía	Fuente de carbono
Autótrofos		
Fotoautótrofos	Luz	Dióxido de carbono
Quimilitotrofos	Reacciones de oxido-reducción de compuestos inorgánicos	Dióxido de carbono
Heterótrofos	Reacciones de oxido-reducción de compuestos orgánicos	Carbono orgánico

Fuente: (Referencia 3: pág. 23)

2.6.1 Microorganismos típicos de los suelos contaminados con hidrocarburos

Entre estos microorganismos podemos mencionar la especie *Pseudomonas* en particular *P. putida*. Esta bacteria pertenece a la subclase proteobacteria la cual posee una temperatura óptima de crecimiento entre el rango de 4 a 22 °C. *Pseudomonas* es una bacteria propia del suelo, y algunos linajes de esta especie han sido considerados como potencial bacteria para aplicaciones biotecnológicas como es la biorremediación de suelos. También las *Mycobacterias*, son bacterias degradadoras de PAH. Tomando como base diversos estudios realizados acerca de la biorremediación de suelos se sabe que en suelos contaminados con hidrocarburos es posible encontrar la presencia de *Pseudomonas sp.*, *Stenotrophomonas matophilia* y *Rhodococcus erythropolis*, *Sphingomonas*, etc. (Referencia 3: págs. 14-23)

Debido a que las comunidades microbianas tienden a responder ante la presencia de contaminantes del petróleo, cambiando su estructura a una que favorece a los organismos capaces de sobrevivir a las nuevas condiciones a expensas de otros organismos que son reprimidas, por lo que se espera que la cantidad de microorganismos disminuya con la concentración de hidrocarburos presentes en el suelo debido a la degradación natural que ocurre en el suelo ante la presencia de contaminantes como los hidrocarburos. (Referencia 3: págs. 14-23).

2.6.1.1 Proceso de biorremediación a través de microorganismos propios del suelo contaminado

Debido a que el tratamiento biológico implica una compleja interacción de diversas especies microbianas la biodegradación de compuestos orgánicos se basa en la oxidación biológica de los mismos por la acción de microorganismos. La degradación espontánea se debe a la actividad de los microorganismos autóctonos o indígenas. Es importante señalar como aspecto fundamental la profunda influencia que ejerce el ambiente sobre las actividades microbianas. Muchos microbios son muy activos en ciertos ambientes, pero muy poco activos en otros.

La tasa de degradación microbiana de hidrocarburos en suelos es afectada por varios parámetros fisicoquímicos y biológicos que incluyen el número y tipos de microorganismos presentes, las condiciones de actividad de degradación microbiana como presencia de nutrientes, oxígeno, pH, presión, salinidad, temperatura, la calidad, cantidad y biodisponibilidad de los contaminantes y características del suelo como tamaño y distribución de partícula. (Referencia 5: págs. 1-8).

2.6.1.2 Biodegradabilidad del sustrato

Como es bien sabido, la mayoría de las sustancias orgánicas son biodegradables, pero también existen los compuestos recalcitrantes a sí como los persistentes, debido a que la biodegradabilidad de un compuesto depende en gran medida de su estructura molecular, de aquí la diferenciación entre los de difícil degradación. (Referencia 5: págs. 1-8)

Pese a que los hidrocarburos alifáticos y aromáticos son estables químicamente existe un gran número de microorganismos tales como bacterias, hongos y levaduras que son capaces de utilizarlos como fuentes de Carbono y de energía. Esta velocidad de oxidación de los microorganismos varía marcadamente, es así como los alcanos saturados se degradan rápidamente, mientras que los alcanos ramificados son más resistentes a la biodegradación que los alcanos normales debido al número de ramificaciones, los hidrocarburos aromáticos son más difíciles de degradar y los hidrocarburos aromáticos policíclicos se degradan en muy baja proporción. (Referencia 5: págs. 1-8).

2.6.1.2.1 Poblaciones microbianas mixtas

Los procesos degradativos naturales se dan por medio de las poblaciones microbianas mixtas, que operan bajo complejas regulaciones simbióticas. Por lo que estas poblaciones son muy eficientes en la utilización de substratos complejos como los residuos de hidrocarburos. (Referencia 20: pág. 170)

Es así como se establece que la velocidad de transformación de moléculas complejas en moléculas sencillas es función directa de la masa microbiana activa. (Referencia 20: pág. 170).

2.6.1.2.2 Mecanismos bioquímicos de degradación

Al hablar de los mecanismos bioquímicos ligados al proceso de degradación, se debe hacer referencia directa a la dependencia de estos sobre las condiciones fisicoquímicas del medio, así como del tipo de sustrato y del microorganismo, ya que cada especie de microorganismos posee una capacidad específica para degradar hidrocarburos, es decir que solo ataca algunos compuestos específicos y en un grado determinado. (Referencia 5: págs. 1-8)

Es por ello que cuando se tiene una mezcla compleja se utilizan de forma combinada las especies degradadoras, a lo que se le denomina consorcio microbiano. (Referencia 5: págs. 1-8).

2.6.1.2.3 Obtención de una microbiología óptima en degradación de hidrocarburos en el suelo

Para obtener una microbiología óptima es fundamental considerar los siguientes factores:

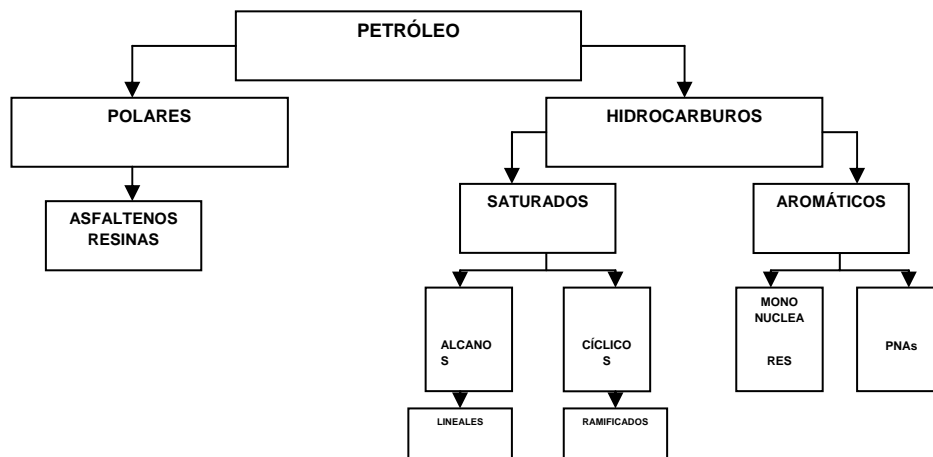
- características del Residuo
 - ✓ Propiedades
 - ✓ Composición

- Microbiología optima
 - ✓ Nutrientes
 - ✓ Humedad
 - ✓ Aireación
 - ✓ Inóculo

2.6.1.2.4 Clasificación de los contaminantes del petróleo

Los contaminantes de petróleo pueden ser clasificados de la siguiente forma

Figura 2 Clasificación de los contaminantes del petróleo



Fuente: (Referencia 2: pág. 126)

2.7 Estimación del potencial de biodegradación

La factibilidad de un proceso de Biorremediación para contaminantes de petróleo se determina mediante estudios de tratabilidad en laboratorio o por caracterización de los hidrocarburos del residuo combinado con la estimación del potencial de biorremediación basado en datos de biodegradabilidad de compuestos específicos. (Referencia 5: págs. 1-8)

2.7.1 Estimación de número de bacterias en suelo

La mayor parte de los suelos contienen gran número de bacterias naturales o indígenas (ej. 10^6 células por gramo de suelo) que son capaces de degradar hidrocarburos de petróleo. (Referencia 5: págs. 1-2)

Como se ha establecido, existen condiciones que inhiben la actividad microbiana, como una alta concentración de sales o metales pesados, la existencia de ciertos compuestos orgánicos, así como una concentración de hidrocarburos superior al 10 %. Para verificar que la población microbiana es adecuada se utiliza un test de cultivos, para contar el número total de bacterias heterotróficas en suelo. (Referencia 5: págs. 2-8)

2.8 Proceso de biorremediación

2.8.1 Diseño de la unidad básica de tratamiento

El suelo contaminado debe ser preparado para optimizar el proceso de tratamiento. (Referencia 5: págs. 1-8).

2.8.1.1 Ajuste del pH del suelo

El pH óptimo para un proceso de biorremediación se encuentra entre 6 y 8. Si el suelo es muy ácido o muy básico se debe corregir por incorporación de agentes correctores tales como arcilla o sulfato de aluminio. (Referencia 5: págs. 1-8).

2.8.1.2 Ajuste del contenido de humedad del suelo

La biodegradación acontece bajo un amplio rango de condiciones de humedad. El suelo no debe estar ni muy seco ni muy húmedo. Un suelo muy seco reduce la actividad microbiana lo cual afecta la degradación. En un suelo muy húmedo limita la transferencia de oxígeno.

Es por ello que la humedad óptima en un suelo depende fundamentalmente del tipo de suelo y se determina usando como criterio un valor correspondiente al 50-70 % de la capacidad de campo. (Referencia 5: págs. 1-8).

2.8.1.3 Adición de fertilizantes

Los microorganismos requieren fuentes de Nitrógeno y de Fósforo para su desarrollo. Durante el proceso de biodegradación los microorganismos incorporan Carbono desde la fuente contaminante juntamente con Nitrógeno y Fósforo del suelo, en su estructura celular. La relación C: N: P de la célula bacteria es aproximadamente 100:20:1. (Referencia 5: págs. 1-8)

Las cantidades de Nitrógeno y Fósforo necesarios para estimular la biodegradación son menores que los requerimientos teóricos debido a que no todo el Carbono proveniente de contaminante es incorporado a la biomasa. Existe un amplio rango de relaciones C: N: P reportadas en la literatura, pero la mejor forma de estimación es mediante el uso de una relación fija C: N: P o mediante la incorporación de Nitrógeno y Fósforo basada en el monitoreo periódico del suelo en tratamiento. (Referencia 5, págs. 1-8)

2.8.1.4 Adición de agentes

En algunos casos se recomienda el uso de agentes de muy bajo costo que mejoren la capacidad de aireación del suelo para de esta forma incrementar la capacidad de drenaje del suelo, tales como restos de vegetales o aserrín. (Referencia 5: págs. 1-8).

2.8.1.5 Remoción e irrigación

Al acondicionar un suelo este debe ser arado e irrigado periódicamente para proveer un adecuado mezclado, aireación y control de humedad. (Referencia 5: págs. 1-8)

El arado se realiza hasta la profundidad de labranza de la herramienta (aproximadamente 25 cm.) con intervalos de dos a cuatro semanas. El agua se incorpora, según el criterio de humectación previamente indicado. (Referencia 5: págs. 1-8)

3. METODOLOGÍA

3.1 Recursos

3.1.1 Localización: La parte experimental de la investigación se realizará en las siguientes instalaciones:

3.1.1.1 Laboratorio Unificado de Química y Microbiología Sanitaria, edificio T-5, Centro de Investigaciones de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

3.1.1.2 Laboratorio de Suelo-Planta-Agua, “Salvador Castillo Orellana”, edificio T-8, segundo nivel, oficina B-9. Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

3.1.2 Recursos humanos

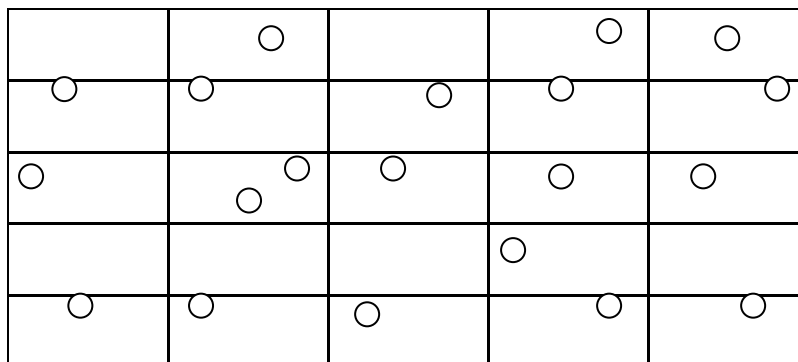
Investigador: Perito Contador. Mariela Elizabeth Santizo Sáenz

Asesor: MSc. Ing. Qco. Zenón Much Santos

3.1.3 Obtención de las muestras

Se colecta suelo contaminado a metros del área de extracción, y suelo sin contaminación cercano al área mediante un muestreo aleatorio, en un conjunto de 10-20 submuestras recogidas dentro del perímetro del suelo de forma aleatoria para hacer un 1kg de muestra total de material rico en microorganismos. Para realizar un buen muestreo y obtener de esta manera resultados creíbles se consultó la norma oficial mexicana 110-SSA1-1994, que trata tanto del correcto muestreo de suelo como de su almacenamiento y transporte.

Figura 3 Patrón de muestreo al azar en bloques



Fuente (Referencia 12: págs. 1-14)

Figura 4 Colección y muestreo aleatorio por bloques en suelos sometidos a presencia de hidrocarburos. (ISO 10381-6, 2002) “Calidad de los suelos: muestreo”



Fuente: (Referencia 11: págs. 1-10)

3.1.3.1 Procesamiento de las muestras de suelo.

Se tamizan ambas muestras por separado de suelo colectado (1kg) utilizando tamiz de 8 pulgadas de diámetro de acero inoxidable autoclaveable, con apertura de 2.36mm. Después de pasarlo por tamiz se guarda en recipientes de vidrio estériles en refrigeración a una temperatura aproximada de 4°C. Posterior a ello se procede a secar una parte del suelo en la incubadora a 37°, hasta eliminar la humedad de la muestra (verificar en la balanza hasta obtener un peso constante).

3.2 Análisis de nutrientes del suelo

3.2.1 Determinación de nitrógeno: método semivocal micro-kjeldahl

1. Pesar con precisión de miligramos 1g de muestra y colocarlo en el matraz kjeldahl; agregar 10g de sulfato de potasio, 0.7g de óxido de mercurio y 20 ml de ácido sulfúrico concentrado.
2. Colocar el matraz en el digestor en un ángulo inclinado y caliente a ebullición hasta que la solución se vea clara, continuar calentando por media hora más. Si se produce mucha espuma, adicionar un poco de parafina.
3. Deje enfriar; durante el enfriamiento adicionar poco a poco alrededor de 90 ml de agua destilada y desionizada. Ya frío agregar 25 ml de solución de sulfato de sodio y mezclar.
4. Agregar una perla de ebullición y 80 ml de la solución de hidróxido de sodio al 40% manteniendo inclinado el matraz. Se formarán dos capas.
5. Conectar rápidamente el matraz a la unidad de destilación, caliente y coleccionar 50 ml del destilado conteniendo el amonio en 50 ml de solución indicadora.
6. Al terminar de destilar se debe remover el matraz receptor, así como enjuagar la punta del condensador y titular con la solución estándar de ácido clorhídrico. (Referencia 21).

Los resultados se reportan de la siguiente forma:

$$\text{Nitrógeno en la muestra (\%)} = 100\left[\frac{(A \times B)}{C} \times 0.014\right] \quad \text{Ecuación 1}$$

A = Acido clorhídrico usado en la titulación (ml)

B = Normalidad del ácido estándar

C = Peso de la muestra (g)

Fuente: (Referencia 14: pág. 3)

3.2.2 Extracción de nutrientes: método Mehlich uno ó método del ácido doble de Carolina del Norte

Extraer. Pesar 5 g o traspasar mediante una cucharita calibrada, 4cm³ de suelo seco cernido con tamiz de 2mm a una botella de extracción de 50ml. Añadir 25 ml de la solución extractora y agitar durante cinco minutos en un agitador con velocidad mínima de 180 oscilaciones por minuto. Filtrar y guardar el extracto de suelo.

Desarrollo del color. Pipetear 2ml de extracto de suelo en tubo de ensayo. Añadir 23ml de la solución de trabajo o solución combinada. Mezclar muy bien y dejar reposar durante 20 minutos. Leer la absorbancia a 880 nm. El espectrofotómetro deberá calibrarse a 0 con un testigo que contenga la solución extractora y la solución combinada. La intensidad de color alcanza su máximo en 20 minutos aproximadamente y se mantiene constante durante 6-8 horas.

Calibración y estándares. Con la solución estándar preparar 6 soluciones estándares de trabajo que contengan de 1 a 10 ppm de P en el volumen final. Hacer todas las diluciones con la solución extractora. Usar una alícuota de 2ml de cada estándar y proseguir el desarrollo de color.

Curva de calibración. Usando un papel semilogaritmico, graficar los datos de absorbencia en la escala logarítmica contra los de ppm P en la escala lineal.

Cálculos:

Ppm P (suelo) = ppm (alícuota) *62.5 **Ecuación 2**

Fuente: (Referencia 17: págs. 204-207)

3.3 Análisis de microorganismos degradadores presentes en el suelo

3.3.1 Búsqueda, aislamiento y selección

3.3.1.1 Búsqueda general:

Inicia con el procesamiento de una muestra de suelo mediante una serie de diluciones, para obtener morfotipos cultivables.

3.3.1.2 Recuento de microorganismos heterótrofos

mesófilos aerobios totales en medio líquido

3.3.1.2.1 Determinación de crecimiento de microorganismos

hidrocarburolíticos

Se extrae una muestra de suelo, se pesa un gramo de la misma y se siembra en un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril rotulado con 10^{-1} que corresponde al primer nivel de dilución (1:10). Se agita continuamente con la pistola de succión automática (unas 25 veces). Se toma 1 ml del sobrenadante con otra pipeta estéril y se lo agrega al segundo tubo con A.D estéril rotulado como 10^{-2} (1:100), correspondiente al segundo nivel de dilución. Se procede de la misma manera hasta el tubo correspondiente a la última dilución 10^{-10} (1:10.000.000.000). De esta manera se espera que los primeros tubos tengan la mayor concentración bacteriana y que en los últimos tienda a cero. Una vez que se dispone de estos 10 tubos conteniendo la solución del suelo se procede a sembrar una alícuota, por triplicado, de cada uno de ellos en un medio rico en este caso en caldo nutritivo realizando la técnica de dilución límite en un medio líquido, así el microorganismo que se busca en un cultivo mixto se va a encontrar en mayor cantidad que cualquiera de los otros microorganismos. Esto es posible gracias al cultivo puro mediante la serie de diluciones en tubo. Solo cuando la muestra está bien diluida contendrá la bacteria que se busca.

3.3.1.2.2 Cálculo del número más probable

Se siembran como mínimo tres tubos para cada dilución. Al cabo de una semana se leen los resultados, tomándose como positivos los tubos con caldo nutritivo en los que ha habido desarrollo (se ven turbios debido a la proliferación de microorganismos). Se toma nota, para cada dilución, del número de tubos positivos (+) y se obtiene un número característico representado por tres cifras. La primer cifra del número característico corresponde al nivel de dilución menos concentrado en el que todos los tubos sean positivos. Una vez que se ha obtenido el número característico, se lo busca la tabla y de Mcgrady en la que figuran todas las combinaciones posibles y para las que se ha calculado, mediante un método estadístico, el número más probable de microorganismos presentes en la muestra.

Se ingresa en la tabla con el número característico y se lee el número más probable de microorganismos en el volumen de siembra. En este caso, en el que el inóculo de partida es un gramo de suelo, se refiere el número final al peso seco de la muestra.

A este número obtenido de la tabla debe multiplicárselo por la inversa de la menor dilución en la que se han hallado 3 (+), es decir que corresponde a la dilución de la primer cifra del número característico. Los resultados se reportan como número de microorganismos por gramo de suelo.

3.3.1.3 Búsqueda específica:

A través de medios selectivos y diferenciales, en la cual se pretende aislar ciertos morfotipos cultivables.

3.3.1.3.1 Inoculación en tubos de agar inclinado

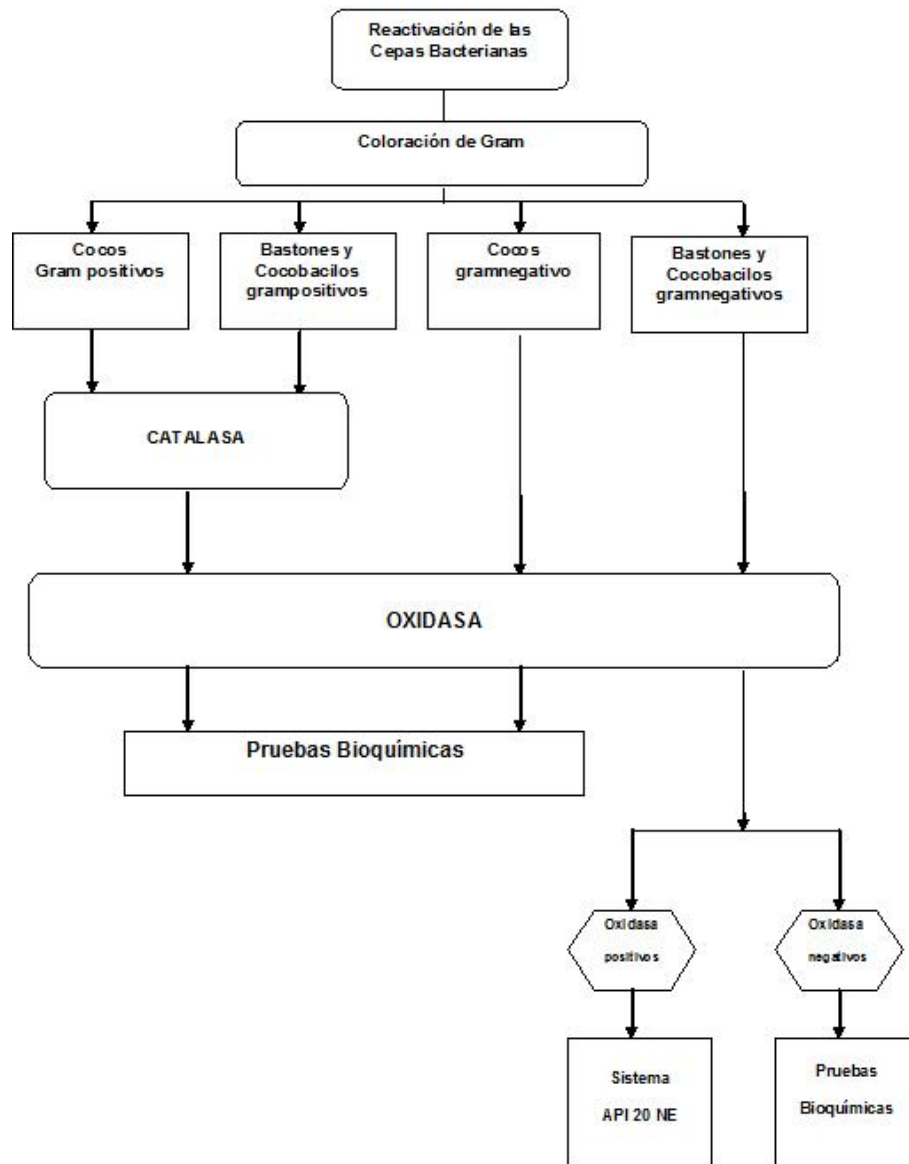
Se derrite el agar en tubos de ensayo, permitiendo que solidifique en forma inclinada. Posterior a ello se inocula desde los tubos con caldo nutritivo que dieron resultado positivo con ayuda del aza atravesando el agar en profundidad, se siembra por estrias la parte inclinada desde abajo hacia arriba, con un movimiento en S, luego de retirar el aza de la parte profunda. Se incuban a 37°C durante 24 a 48 horas (observar desarrollo microbiano), para posteriormente realizar el cultivo

3.3.1.3.2 Cultivo por placa estriada

Se cultivo mediante una sola asada de inóculo obtenido de los tubos con agar inclinado, sobre la superficie de agar solidificado en la caja de Petri. Después de realizar la inoculación. Las cajas de Petri se incuban a 37°C durante 24-72 horas aproximadamente en posición invertida para evitar que el agua de condensación que se forma en la caja Petri se deposite sobre la superficie del medio, provocando que las colonias de bacterias se junten y sea imposible decir donde empieza y termina cada una de ellas.

El paso posterior al cultivo por placa estriada es la identificación de las bacterias degradadoras. Como los microorganismos se obtienen de suelo contaminado con hidrocarburos, es decir suelo rico en componentes orgánicos, las bacterias a identificar son heterótrofas, así como los demás microorganismos que participan en el proceso de degradación. El suelo contaminado proporciona el CO₂ necesario requerido por los microorganismos para subsistir y degradar, condición que se debe controlar a mayor escala (campos de biorremediación).

Figura 5 Método de identificación de bacterias oleofílicas



Fuente: (Referencia 5: pág. 27)

3.3.1.3.3 Identificación de microorganismos degradadores.

3.3.1.3.3.1 Preparación del frotis

1. Colocar una pequeña gota de agua en el centro de un portaobjetos limpio. Es necesaria muy poca cantidad de agua, por lo que se puede usar el asa de siembra, ya que en el extremo curvo de su filamento queda retenida una mínima gota de agua, que resulta suficiente.
2. Flamear el asa de siembra, tomar, en condiciones asépticas, una pequeña cantidad del cultivo bacteriano en medio sólido y transferirlo a la gota de agua. Remover la mezcla con el asa de siembra hasta formar una suspensión homogénea que quede bastante extendida para facilitar su secado.
3. Si la muestra se toma de un cultivo en medio líquido, no es necesario realizar los dos primeros pasos, ya que basta con colocar y extender una gota de la suspensión bacteriana, que se toma con el asa de siembra, directamente sobre el portaobjetos.
4. Esperar hasta que el líquido se evapore o acelerar su evaporación acercando el portaobjetos a la llama del mechero. En este caso hay que tener mucha precaución de no calentar demasiado el portaobjetos pues las células pueden deformarse o romperse.

3.3.1.3.3.2 Fijación de las bacterias al portaobjetos

Pasar tres veces el portaobjetos por la llama durante unos segundos. Dejar enfriar el portaobjetos entre los pases.

Una vez realizado el frotis y fijadas las bacterias, las preparaciones pueden ser observadas al microscopio, aunque carecen de contraste.

3.3.1.3.3 Técnica de tinción de Gram

A partir de los frotis, se inicia el proceso de tinción

- Teñir con cristal violeta 1min.
- Lavar con abundante agua el exceso de colorante.
- Cubrir con Lugol 1min.
- Lavar con agua el exceso de Lugol.
- Decolorar con alcohol-acetona o simplemente con alcohol hasta que la preparación deje de perder color (30seg)
- Lavar con abundante agua para eliminar el resto de disolvente.
- Teñir con safranina 1min.
- Lavar con agua para eliminar el colorante de contraste.
- Secar la preparación.
- Examinar al microscopio fijándose sobre todo en el color de cada preparación, y anotar los resultados

3.3.1.3.4 Examen al microscopio

Por medio del examen microscópico, se podrán observar las características de los grupos microbianos.

- Morfología: (cocos, bacilos, cocobacilos, espirilos)
- Agrupación: (pares, cadenas, tétradas, racimo, etc.)
- Afinidad: Gram+ o Gram-

Se deben anotar todas las observaciones, posteriormente se realizan las pruebas bioquímicas. Para identificar los grupos bacterianos.

3.3.1.3.5 Pruebas Bioquímicas

3.3.1.3.5.1 Prueba de la Catalasa

3.3.1.3.5.1.1 Método del portaobjetos

- Con el asa de siembra recoger el centro de una colonia pura de 18-24 horas y colocar sobre un portaobjetos limpio de vidrio.
- Agregar con gotero o pipeta Pasteur una gota de H₂O₂ al 30% sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo.
- Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).
- Desechar el portaobjetos en un recipiente con desinfectante.

3.3.1.3.5.2 Prueba de la Oxidasa

3.3.1.3.5.2.1 Método en placa directa

- Agregar directamente 2-3 gotas de reactivo a algunas colonias. No inundar toda la placa y no invertirla.
- Observar los cambios de color. Con el reactivo de Kovacs la reacción se produce en unos 10-15 segundos.

3.3.1.4 Cultivo, multiplicación y conservación de cepas

microbianas capaces de degradar hidrocarburos.

Identificados los grupos microbianos predominantes en las muestras, se procede a realizar una resiembra en agar a partir de diluciones seriadas.

3.3.1.5 Bioaumentación y producción de cultivos

Ya seleccionados los morfotipos, se conformará el consorcio microbiano degradador que mediante la técnica de bioaumentación se diseña una proporción a mayor escala según el volumen de suelo contaminado así como la concentración del contaminante y el tipo de crudo que contaminó el suelo. Es importante señalar que la vida de anaquel del producto es función directa del tiempo de vida estimado de los microorganismos que formarán el consorcio microbiano, determinado a través del cálculo del número más probable de microorganismos hidrocarburolíticos obtenido durante el monitoreo (4 semanas).

3.4 Herramientas para la experimentación

3.4.1. Materiales y equipo a utilizar

3.4.1.1. Materia prima

- Suelo contaminado con crudo de petróleo, procedentes del área de Granjas tratamiento, y de lugares cercanos al área de extracción.
- Suelo no contaminado, cercano al área de extracción.
- Medios de cultivo (ver anexos)

3.3.1.2 Cristalería

- Cajas de petri
- Pinzas estériles
- Cubre objetos
- Pipeta graduada estéril (10ml)
- Mechero bunsen
- Micro pipetas (1ml)
- Earlenmeyers
- Varillas de agitación
- Probetas graduadas
- Perlas de ebullición
- Tubos de ensayo estériles.
- Termómetros
- Aza
- Matraces Kjeldahl de 500 ml.

3.3.1.3 Equipo

Campana de extracción

Marca: Labconco Purifier
Hecha en Estados Unidos.

Incubadora

Marca: Thelco precisión
Modelo: 6
Rango temperatura: hasta 65°C

Balanza

Marca: Sartorius
Modelo: Cp2201
Capacidad máxima 2200g

Mufla

Marca: Despatch oven
Modelo: 289
Potencia: 150 Watts

Microscopio de barrido electrónico

Marca: Merck

Plancha de calentamiento

Marca: CORNING.

Modelo: PC-620.

Voltaje: 120 Volt.

Frecuencia: 60 Hz.

Potencia: 1113 Watts.

Hecha en Estados Unidos.

Refrigeradora

Marca: Daewoo.

Modelo: FR-147RV.

Voltaje: 115 - 120 Volt.

Frecuencia: 60 Hz.

Amperaje 1.1 Amperes.

Refrigerante: R-134a.

Hecha en Korea.

Autoclave

Unidad de digestión y destilación Kjeldahl.

3.3.1.4 Reactivos

- Etanol Grado Industrial marca Merck
- Agua destilada esterilizada
- Caldo nutritivo
- Caldo lactosado
- Medios de cultivo selectivos
- Agar nutritivo
- Solución de hidróxido de sodio al 40%; disolver 400 g de hidróxido de sodio en agua y diluir a 1,000 ml.
- Solución de sulfato de sodio al 4%.
- Solución indicadora de ácido bórico; agregar 5 ml de una solución con 0.1% de rojo de metilo y 0.2% de verde de bromocresol a un litro de solución saturada de ácido bórico.
- Solución estándar de ácido clorhídrico 0.1N.
- Peróxido de hidrogeno al 3%.
- Cristal violeta
- Safranina
- Lugol
- Solución etanol-acetona.

- Método de Mehlich

Solución extractora (HCl 0.05N en H₂SO₄ 0.025N). Pipetear 4ml de HCl concentrado y 0.7ml de H₂SO₄ en un frasco volumétrico de 1 litro y aforar con agua destilada.

Solución de ácido ascórbico. Disolver 176g de ácido ascórbico en agua destilada y aforar hasta la marca en un matraz volumétrico de 2 litros. Guardar en frasco de vidrio, en lugar oscuro y bajo refrigeración.

Solución de molibdosulfúrico. Disolver 100g de molibdato de amonio (NH₄) Mo₇O₂₄.4H₂O en 599 ml de agua destilada. Disolver 2.425g de tartrato doble de potasio y antimonio. K(SbO)C₄H₄O₆.1/2 H₂O en la solución de molibdato. Añadir 1400 ml de H₂SO₄ concentrado y mezclar bien. Dejar enfriar y diluir a 2 litros con agua destilada. Guardar en botella de pyrex o de polietileno en lugar oscuro, bajo refrigeración.

Solución de trabajo. (Solución combinada). Diluir 10 ml de la solución de ácido ascórbico y 20 ml de la solución de molibdo-sulfúrico con agua destilada hasta 1 litro. Dejar la solución reposar cuando menos una hora antes de usarla. Esta solución se establece por dos o tres días.

Solución patrón de fósforo (1,000ppm). Pesar 3.85g de (NH₄H₂PO₄) fosfato diácido de amonio en un frasco volumétrico de 1 litro y diluir con solución extractora hasta la marca de aforo. Preparar estándares 1, 2, 5, 10, 15, 20 ppm P haciendo diluciones a partir de la solución de 1,000ppm con la solución extractora.

- **Reactivo de Kobacs**

Alcohol amílico o isoamílico (puede sustituirse por alc. Butílico).....150ml

p-dimetilamino-benzaldehído.....10g

HCl (concentrado)..... 50ml

Se disuelve primero el aldehído en el alcohol y después se agrega lentamente a esta mezcla al ácido.

4. RESULTADOS

Tabla VIII Identificación, afinidad y pruebas bioquímicas por número de muestra dilución 1.1-4.1 (diluciones positivas por duplicado)

No. Muestra	Identificación		Afinidad		Pruebas bioquímicas	
	Morfología	Agrupación	Gram +	Gram-	Catalasa	Oxidasa
1.1	bastones	bacilos curvos		coloración rojiza-rosada	formación de burbujas	coloración morada
1.2	bastones	bacilos curvos		coloración rojiza-rosada	formación de burbujas	coloración morada
2.1	bastones	bacilos	coloración violeta		formación de burbujas	No se observó reacción
2.2	cocos	colonias rojo-rosadas	coloración violeta		formación de burbujas	No se observó reacción
3.1	bastones	bacilos curvos		coloración rojiza-rosada	formación de burbujas	No se observó reacción
3.2	cocos	estafilococos, tétradas	coloración violeta		formación de burbujas	No se observó reacción
4.1	cocos	estafilococos, tétradas	coloración violeta		formación de burbujas	No se observó reacción

Fuente: Análisis experimental

Tabla IX. Identificación, afinidad y pruebas bioquímicas por número de muestra dilución 4.2-10.1 (diluciones positivas por duplicado)

No. muestra	Identificación		Afinidad		Pruebas bioquímicas	
	Morfología	Agrupación	Gram +	Gram-	Catalasa	Oxidasa
4.2	cocos	estafilococos tétradas	coloración violeta		formación de burbujas	No se observó reacción
5.1	bastones	bacilos curvos		coloración rojiza-rosada	formación de burbujas	No se observó reacción
5.2	bastones	bacilos curvos		coloración rojiza-rosada	formación de burbujas	No se observó reacción
6.1	estafilococos	racimos	coloración violeta		formación de burbujas	coloración morada
6.2	bastones	bacilos curvos		coloración rojiza-rosada	formación de burbujas	coloración morada
8.1	bastones	bacilos	coloración violeta		formación de burbujas	No se observó reacción
9.1	cocos	racimos	coloración violeta		formación de burbujas	coloración morada
10.1	cocos	racimos	coloración violeta		formación de burbujas	coloración morada

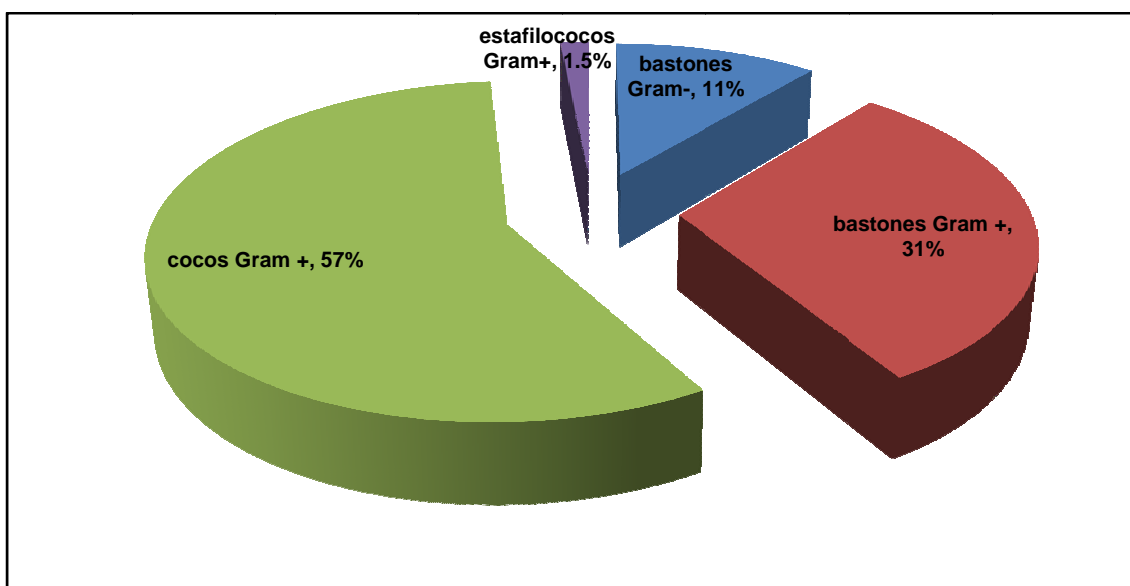
Fuente: Análisis experimental

Tabla X. Identificación y aislamiento de bacterias hidrocarburohíticas en porcentaje

Morfología	% (microorganismos/gramo suelo)
bastones Gram-	11
bastones Gram +	30.5
cocos Gram +	57
estafilococos Gram+	1.5

Fuente: Análisis Experimental

Figura 6. Gráfico del porcentaje de bacterias hidrocarburohíticas por gramo de suelo



Fuente: Datos calculados

Tabla XI Población del consorcio bacteriano propio del suelo contaminado

Especie
pseudomonas aeruginosa
bacillus subtilis
micrococcus
pseudomonas vesicularis
estafilococos
estafilococos aureus

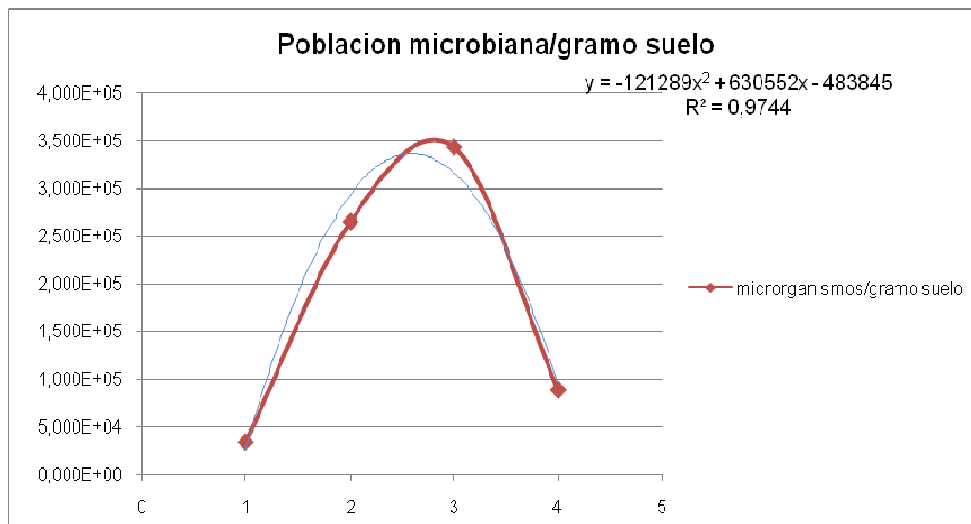
Fuente: Análisis experimental

Tabla XII Población microbiana por gramo de suelo (muestra 1)

Tiempo	Microorganismos/gramo suelo
semana 1	3,443E+04
semana 2	2,651E+05
semana 3	3,432E+05
semana 4	8,873E+04

Fuente: Datos calculados

Figura 7. Gráfico del porcentaje de población microbiana por gramo de suelo respecto al tiempo (muestra 1).



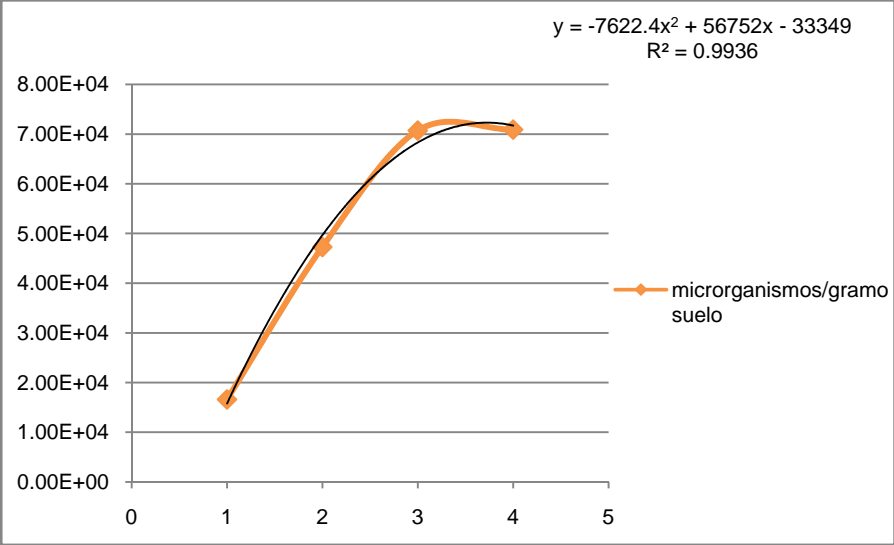
Fuente: Datos calculados

Tabla XIII Población microbiana por gramo de suelo (muestra 2)

Tiempo	Microorganismos/gramo suelo
semana 1	1,69E+04
semana 2	2,63E+05
semana 3	2,59E+05
semana 4	1,85E+05

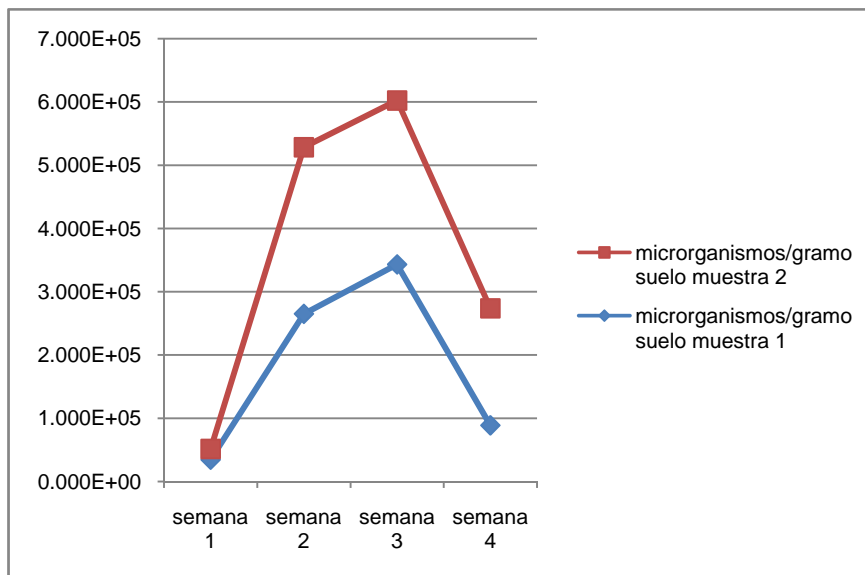
Fuente: Datos calculados

Figura 8 Gráfico del porcentaje de población microbiana por gramo de suelo respecto al tiempo (muestra 2).



Fuente: Datos calculados

Figura 9. Gráfico comparativo de la evolución de la población microbiana por gramo de suelo respecto al tiempo.



Fuente: Datos calculados

Tabla XIV Análisis químico, materia orgánica del suelo sin contaminación

Identificación	pH	Ppm		Meq/100g		Ppm				% M.O.
		P	K	Ca	Mg	Cu	Zn	Fe	Mn	
RANGO MEDIO		12.0-16.0	120- 150	6.0-8.0	1.5-2.5	2.0-4.0	4.0-6.0	10.0-15.0	10.0-15.0	
TESTIGO	6.7	2.50	55	16.54	1.80	1.50	2,5	33,5	36	3,48

Fuente: Análisis experimental

Tabla XV Análisis clase textural del suelo

IDENT	g/cm ³ Da	%					CLASE TEXTURAL
		1/3 ATM	15 ATM	Arcilla	Limo	Arena	
TESTIGO	1	27,19	23,47	69,05	13,19	17,76	ARCILLOSO

Fuente: Análisis experimental

Tabla XVI Análisis químico, materia orgánica del suelo contaminado

Identificación	pH	Ppm		Meq/100g		ppm				% M.O.
		P	K	Ca	Mg	Cu	Zn	Fe	Mn	
RANGO MEDIO		12.0-16.0	120-150	6.0-8.0	1.5-2.5	2.0-4.0	4.0-6.0	10.0-15.0	10.0-15.0	
TESTIGO 2	6.6	5.43	73	7.49	2.16	0.50	11.50	588	148.0	13.84

Fuente: Análisis experimental

5. DISCUSIÓN RESULTADOS

A partir de 5 gramos de la muestra total colectada de suelo contaminado con hidrocarburos, previo proceso de muestreo, se identificaron 6 especies bacterianas *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus*, *Pseudomonas vesicularis*, *Estafilococcus* y *estafilococcus aureus*, estos microorganismos se caracterizan por sus capacidades degradadoras ya que utilizan el contaminante presente en el suelo como fuente de carbono y oxígeno. Para realizar el proceso de identificación, se partió del procesamiento de la muestra y la preparación de diluciones seriadas a partir de un gramo de muestra de suelo. (10^{-1} a 10^{-10}), se agregó un ml de cada dilución en tubos de ensayo conteniendo caldo nutritivo, el proceso se realizó por triplicado, mediante incubación a 37°C durante 24 horas, se realizó el análisis de turbidez de los tubos mediante el método del número más probable. Utilizando la tabla de Mcgrady para tres replicas por dilución se obtuvo el número de microorganismos por gramo de suelo. A partir de este valor se monitoreó la turbidez durante 4 semanas como indicador de desarrollo microbiano. Los microorganismos desarrollados (positivos) en caldo nutritivo, se sembraron en tubos con agar inclinado, se incubaron a 37°C por un período de 24-48 horas, posterior a ello se realizó una resiembra en placas con agar, se incubaron a 37°C por 24 horas. Estas resiembras se utilizaron como fuente de microorganismos para preparar los frotis por duplicado. Una vez fijados los microorganismos al portaobjetos se procedió a realizar las tinciones de Gram, proceso previo a la observación microscópica, se anotaron las principales características observadas, así como el resultado de las tinciones. Para identificar las familias bacterianas, se realizaron pruebas bioquímicas: catalasa y oxidasa, con estos parámetros se obtuvo la diferenciación de las familias bacterianas.

Debido a que las especies identificadas ya han sido aisladas previamente por otros autores, a partir de sitios contaminados y reportadas por su capacidad de degradar una amplia variedad de compuestos orgánicos, se tomo como base de diferenciación conjuntamente con las pruebas bioquímicas y los resultados obtenidos mediante tinciones de Gram, definiendo así las especies bacterianas identificadas en la muestra de suelo como se muestra en la Tabla I.

Las bacterias pertenecientes al genero *Pseudomonas* son bacilos rectos o curvos no poseen vainas ni apéndices. Su metabolismo es respiratorio, nunca fermentativo. Algunas especies son litotroficas pudiendo emplear H_2 , entre otros, como único dador de electrones. Asimismo pueden emplear el NO_3^- como aceptor de electrones en anaerobiosis. La prueba de la oxidasa es generalmente positiva y catalasa lo es siempre. (Referencia 9).

Las bacterias pertenecientes al género *Micrococcus* poseen células esféricas que pueden agruparse de a pares tétradas o en forma irregular. Constituyen bacterias aerobias estrictas, su metabolismo es respiratorio, crecen bien en medios simples. En el caso de *M.roseus*, *M. sedentarius* y *M. varians* la prueba de oxidasa es negativa. Son relativamente resistentes a un reducido potencial de agua, toleran bien la desecación y la presencia de alto contenido de sales (hasta 7.5%), característica que comparten con el género *pseudomonas*. Los *micrococcus* son capaces de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos. (Referencia 1).

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, se caracterizan por su resistencia a altas temperaturas, su forma característica son bastones

Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas Vesicularis* constituyen bacilos rectos o curvos no esporulados. Esta especie es capaz de crecer en concentraciones altas de plomo (hasta 1500 ppm de Pb_3O_4) 1500 ppm de Pb_3O_4) (Referencia 13).

Las bacterias pertenecientes al género estafilococo constituyen cocos agrupados en racimos, han sido aislados por otros autores, quienes reportan que este género tiene alta capacidad para degradar hidrocarburos aromáticos. Se identificó el género estafilococos aureos, mediante las pruebas bioquímicas. Obteniendo la población microbiana por gramo de suelo, mediante la técnica del número más probable, esta determinación se realizó por duplicado. La figura 4 constituye un análisis comparativo entre la muestra 1 y muestra 2. A 4°C los microorganismos heterótrofos muestran cierta inhibición de crecimiento, factor que a temperatura ambiente favorece el crecimiento microbiano en la muestra dos que fue sometida a congelación durante una semana antes de realizar las diluciones seriadas para desarrollar la técnica del número más probable.

Se determinó la relación predictiva mediante ecuaciones de tendencia que relacionan el tiempo respecto al crecimiento microbiano en la muestra, esto como indicador de vida promedio de los microorganismos degradadores.

Se realizó análisis químico del suelo identificando la clase textural, este análisis se utilizó como base para diseñar un tratamiento adecuado del sitio. El pH del suelo sin contaminación es de 6.7, mientras que el pH en el suelo contaminado presenta un valor de 6.6, es decir se acidificó el suelo con la presencia del contaminante. Como condición óptima para el tratamiento de biorremediación, se establece un rango entre 6 y 8, los valores fuera de este rango se deben corregir por incorporación de agentes correctores tales como arcilla o sulfato de aluminio. (Referencia 5: págs. 1-8). Por lo que el suelo se encuentra en condiciones óptimas de pH, debido a que el mismo presenta una clase textural arcillosa, que facilita el proceso de biorremediación.

El contenido en ppm de fosforo aumento en el suelo contaminado. Los microorganismos requieren fuentes de Nitrógeno y de Fósforo para su desarrollo. Durante el proceso de biodegradación los microorganismos incorporan Carbono desde la fuente contaminante juntamente con Nitrógeno y Fósforo del suelo, en su estructura celular. La relación C: N: P de la célula bacteriana es aproximadamente 100:20:1. (Referencia 5: págs. 1-8)

Las cantidades de Nitrógeno y Fósforo necesarios para estimular la biodegradación son menores que los requerimientos teóricos debido a que no todo el Carbono proveniente de contaminante es incorporado a la biomasa. Existe un amplio rango de relaciones C: N: P reportadas en la literatura pero la mejor forma de estimación es mediante el uso de una relación fija C: N: P o mediante la incorporación de Nitrógeno y Fósforo basada en el monitoreo periódico del suelo en tratamiento. (Referencia 5: págs. 1-8).

CONCLUSIONES

1. Se identificaron seis especies bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus*, *Pseudomonas vesicularis*, *Estafilococcus* y *estafilococcus aureus*. Estos microorganismos se caracterizan por sus capacidades degradadoras, ya que utilizan el contaminante presente en el suelo como fuente de carbono y oxígeno.
2. Las bacterias pertenecientes al género *pseudomonas* son bacilos rectos o curvos no poseen vainas ni apéndices. Su metabolismo es respiratorio, nunca fermentativo. Algunas especies son litotróficas pudiendo emplear H_2 , entre otros, como único dador de electrones. Asimismo pueden emplear el NO_3^- como aceptor de electrones en anaerobiosis.
3. Las bacterias pertenecientes al género *Micrococcus* poseen células esféricas que pueden agruparse de a pares tétradas o en forma irregular. Constituyen bacterias aerobias estrictas, su metabolismo es respiratorio. Son considerados resistentes a un reducido potencial de agua, toleran bien la desecación y la presencia de alto contenido de sales (hasta 7.5%), característica que comparten con el género *pseudomonas*. Los *micrococcus* son capaces de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos.
4. Las bacterias pertenecientes al género *estafilococo* constituyen cocos agrupados en racimos, han sido aislados por otros autores, quienes reportan que este género tiene alta capacidad para degradar hidrocarburos aromáticos. Se identificó el género *estafilococos aureos*, mediante las pruebas bioquímicas.

5. Se determinó la relación entre el tiempo y el número de microorganismos degradadores, a partir de la muestra de suelo contaminado por medio de diluciones seriadas, registrando los valores de turbidez obtenidos en función del tiempo como se muestra en la figura 1 y 2.
6. La figura 4 constituye un análisis comparativo entre la muestra uno y muestra dos. A 4°C los microorganismos heterótrofos muestran cierta inhibición de crecimiento, factor que a temperatura ambiente favorece el crecimiento microbiano en la muestra dos que fue sometida a congelación durante una semana antes de realizar las diluciones seriadas para desarrollar la técnica del número más probable.
7. La relación entre el tiempo y el número de microorganismos degradadores, a partir de la muestra contaminada de suelo (figura 2 y 3), se realizó semanalmente tomando la semana 1 como inicio o punto de partida en la observación y análisis de turbidez para desarrollar la técnica del número más probable.
8. La muestra uno se ajusta a un polinomio de grado 2, mostrando el máximo desarrollo microbiano en la semana 3, al igual que la muestra 2, que a diferencia de la 1 muestra un mayor número de microorganismos activos.
9. El pH del suelo sin contaminación presentó un valor de 6.7, mientras que el pH en el suelo contaminado presenta un valor de 6.6. El suelo contaminado presentó acidificación debido a la presencia del contaminante.

10. Como condición óptima para el tratamiento de biorremediación, se establece un rango entre 6 y 8, los valores fuera de este rango se deben corregir por incorporación de agentes correctores tales como arcilla o sulfato de aluminio. Los resultados obtenidos para ambas muestras de suelo, reflejan la acción de la clase textural del suelo, (arcilloso). Por lo que el suelo se encuentra en condiciones óptimas de pH condición que facilita el proceso de biorremediación.

11. Las bacterias identificadas, son referidas bibliográficamente por otros autores en conjunto con otras especies bacterianas como bacterias hidrocarburohíticas. por lo que se tomaron como referencia en la presente investigación, considerando que los microorganismos identificados dependen exclusivamente del tipo de suelo y del contaminante.

12. Para la implantación de una tecnología de biorremediación, se deben cumplir las siguientes etapas: Desarrollo de ensayos de tratabilidad a escala de laboratorio. Desarrollo de ensayos a escala piloto. Implantación de la tecnología de biorremediación escogida.

13. Para evaluar si un tratamiento biológico es apropiado para la descontaminación de un suelo, es necesario caracterizar, tanto las poblaciones microbianas como la biodegradabilidad de los contaminantes del suelo. Aunados los factores fisicoquímicos y biológicos que condicionan el proceso de biorremediación.

14. Las cantidades de nitrógeno y fósforo necesarios para estimular la biodegradación son menores que los requerimientos teóricos debido a que no todo el carbono proveniente de contaminante es incorporado a la biomasa. La mejor forma de estimación es mediante el uso de una relación fija C: N: P o mediante la incorporación de nitrógeno y fósforo basada en el monitoreo periódico del suelo en tratamiento.

15. Los géneros bacterianos hidrocarburolíticos identificados, así como las características del suelo, se toman como base para un proceso de biorremediación

RECOMENDACIONES

1. Realizar un estudio de cuantificación de hidrocarburos totales en la muestra de suelo contaminado a estudiar para establecer la concentración y los componentes hidrocarbonados al inicio y durante cada semana hasta concluir con las seis semanas de análisis. Esto como indicador de degradación y efectividad de biodegradación del consorcio microbiano exógeno.
2. Realizar un estudio de degradación de crudo en muestras de suelo contaminado, y monitorear durante un período aproximado de seis semanas la biodegradación utilizando las cepas aisladas identificadas en la presente investigación.
3. Para ampliar y establecer condiciones óptimas de degradación, se debe realizar el estudio de biodegradación en suelos contaminados de diferentes clases texturales, utilizando las cepas identificadas en la presente investigación, para optimizar el proceso de biodegradación.
4. Monitorear factores como pH, temperatura, humedad, nutrientes (F, N) del suelo a tratar, para diseñar un proceso adecuado de biorremediación.
5. Utilizar como método alternativo para el recuento de microorganismos, la técnica de conteo directo para determinar las unidades formadoras de colonias. Al igual que la técnica del número más probable ambas parten de diluciones seriadas.

6. Diseñar un ensayo de tratabilidad a escala de laboratorio previo a la implementación de cualquier tecnología de biorremediación en un suelo contaminado.
7. Posterior al ensayo de tratabilidad a escala laboratorio, se debe implementar el mismo a escala piloto.
8. Se sugiere controlar el crecimiento bacteriano mediante lecturas de turbidez como inicio o punto de partida en la observación el día posterior a la preparación de las diluciones previas a desarrollar la técnica del número más probable. Con la finalidad de tener un punto más cercano o punto de inicio cero para establecer la relación entre el tiempo y el número de microorganismos degradadores a partir de la muestra contaminada de suelo.
9. Se recomienda controlar el crecimiento bacteriano, mediante la medición directa de turbidez del medio de cultivo, utilizando un espectrómetro HACH DR/4000U a una longitud de onda de 550nm, partiendo de las diluciones en el inicio o punto de partida como control, tomando las medidas de turbiedad como positivas si son significativamente mayores a la lectura de las muestras control.

BIBLIOGRAFÍA

1. Altamirano María Gabriela y Pozzo Ardizzi María Graciela. **“Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarburolicas provenientes de un suelo sometido a biorremediación”**. XXVII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Brasil 2005. Pp. 2-5.
2. BARBERII, Efraín. **“El Pozo ilustrado”**, Venezuela: Fondo Editorial del Centro Internacional de Educación y Desarrollo. 2004. Pp. 270-290
3. Brock Thomas, D. **“Microbiología”**. Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A. Cuarta edición.1987. Pp. 180-187
4. Chang Raymond. **“Química”**. México: Editorial McGraw-Hill. 2000 sexta edición Pp. 939-965.
5. Contreras Araneda Patricia A. **“Suelos contaminados Con hidrocarburos RNA 16S como indicador de Impacto”**. Chile 2005. Pp. 1-10.
6. DEPARTAMENTO de comercialización y precios de la Dirección general de hidrocarburos del Ministerio de Energía y Minas. **Petróleo crudo**. Guatemala, 2006. Pp. 1-7.
7. Ercoli, E.C. y autores, Tratamiento Biológico ex-situ de residuos semisólidos de oleoductos. **“1º Encuentro Latinoamericano para la Calidad en la Industria Petrolera”**. Pp. 311-318 (1995).

8. Ercoli, E.C. y autores, **“Tratamiento Biológico de Lodos de Refinería”**. 2º Simposio de Producción de Hidrocarburos: Pp. 497-506 (1995).

9. Macbee, Richard. **“Microbiología General”**. México: Editorial Continental, 1965. Pp. 11-265.

10. Molina Llarden, Mario. **“Microbiología de suelos y técnicas fitopatológicas”**. (volumen 24). Guatemala: Editorial Universitaria 1957. Pp 56-63.

11. Perenco Limited **“Procedimiento general de remediación para tratamiento de suelos con hidrocarburos”**. Manual de procedimientos. 2006. Pp. 1-3.

12. Santelises-Etchevers-Castellanos, Andrés-Jorge-Javier. **“Normalización de técnicas para mejorar nuestra ciencia”**. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. México 1987. Pp. 140-141.

13. Schleider & Schuell **“Microbiología”**. Catalogo especializado. Whatman 2003/2004. Pp. 4-5.

14. Steinberg, K. G. **“Química del petróleo y del gas”**. Moscú: Editorial Mir Moscú, 1984. Pág.: 407.

15. Simposio Nacional sobre análisis químico para evaluar la fertilidad del suelo. México 1985. Pp. 1-5.

16. Troeh Frederick y Palmer, Robert. **“Introducción a la ciencia del suelo”**. México: Editorial Editor, 1980. Pp 95-110.

17. Vargas-Cuellar-Dussan **“Biorremediación de Residuos del Petróleo”**. Centro de Investigaciones Microbiológicas. Universidad de los Andes. Colombia 2004. Pp. 42-48.

18. Viñas Canals, Marc. **“Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica”**. Universidad de Barcelona, Facultad de Biología. Departamento de Microbiología. 2005. Pp. 17-65.

19. Volk, Wesley. **“Microbiología Básica”**. Editorial Harla, séptima edición 1996. Pp. 712-727.

20. Volke Sepúlveda, Tania y Velasco Trejo, Juan Antonio. **“Tecnologías de remediación para suelos contaminados”**. México: Instituto Nacional de ecología INE-SEMARNAT. 2002. Pág. 64.

21. <http://bilbo.edu.uy/~microbio/identific02.html>. 05 de febrero de 2008.

APÉNDICE A

Tabla XVII Monitoreo de la turbidez muestra 1, por semana

ANÁLISIS	NÚMERO CARACTERÍSTICO									
	1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03	1,00E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00E-07	1,00E-08	1,00E-09	1,00E-10
SEMANA 1	333	333	332	321	210	100	0,00	0,00	0,00	0,00
06/08/2008 13/08/2008										
SEMANA 2	333	333	333	331	311	110	101,00	11,00	11,00	1,00
13/08/2008 20/08/2008										
SEMANA 3	333	332	321	213	131	313	131,00	312,00	12,00	2,00
20/08/2008 27/08/2008										
SEMANA 4	333	332	322	221	211	110	101,00	10,00	10,00	0,00
27/08/2008 03/09/2008										

Tabla XVIII Monitoreo de la turbidez muestra 2, por semana

ANÁLISIS	NIVEL DE DILUCIÓN																													
SEMANA 1	1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03	1,00E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00E-07	1,00E-08	1,00E-09	1,00E-10																				
09/08/2008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
16/08/2008	3			3			3			3			1			1			0			0			0			0		
SEMANA 2	1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03	1,00E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00E-07	1,00E-08	1,00E-09	1,00E-10																				
16/08/2008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
25/08/2008	3			3			3			2			1			0			0			0			1					
SEMANA 3	1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03	1,00E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00E-07	1,00E-08	1,00E-09	1,00E-10																				
25/08/2008	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
30/08/2008	3			3			2			3			2			1			0			0			0			1		
SEMANA 4	1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03	1,00E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00E-07	1,00E-08	1,00E-09	1,00E-10																				
30/08/2008	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
09/09/2008	3			3			2			3			2			1			0			0			0			0		

Tabla XIX Obtención del número característico muestra, por semana

ANÁLISIS	NÚMERO CARACTERÍSTICO									
	1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03	1,00E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00E-07	1,00E-08	1,00E-09	1,00E-10
SEMANA 1	333	333	332	321	210	100	0,00	0,00	0,00	0,00
06/08/2008 13/08/2008										
SEMANA 2	333	333	333	331	311	110	101,00	11,00	11,00	1,00
13/08/2008 20/08/2008										
SEMANA 3	333	332	321	213	131	313	131,00	312,00	12,00	2,00
20/08/2008 27/08/2008										
SEMANA 4	333	332	322	221	211	110	101,00	10,00	10,00	0,00
27/08/2008 03/09/2008										

Tabla XX Obtención del número característico muestra 2, por semana

ANÁLISIS	NÚMERO CARACTERÍSTICO									
	1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03	1,00E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00E-07	1,00E-08	1,00E-09	1,00E-10
SEMANA 1	333	333	331	311	110	100	0	0	0	0
09/08/2008 16/08/2008										
SEMANA 2	333	333	332	321	210	100	0	1	1	1
16/08/2008 25/08/2008										
SEMANA 3	332	323	232	321	210	100	0	1	1	1
25/08/2008 30/08/2008										
SEMANA 4	332	323	232	321	210	100	0	0	0	0
30/08/2008 09/09/2008										

Tabla XXI Obtención del número de microorganismos muestra 1, por semana

ANÁLISIS	NÚMERO DE MICROORGANISMOS									
	1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03	1,00E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00E-07	1,00E-08	1,00E-09	1,00E-10
SEMANA 1	140	140	110	15	1.5	0.4	0	0	0	0
06/08/2008 13/08/2008										
SEMANA 2	140	140	110	45	7.5	0.7	0.7	0.6	0.7	0.4
13/08/2008 20/08/2008										
SEMANA 3	140	110	15	2.88	1.44	16	1.44	11.5	1.1	0.3
20/08/2008 27/08/2008										
SEMANA 4	140	110	20	3	2	0.7	0.7	0.3	0.3	0
27/08/2008 03/09/2008										

Tabla XXII Obtención del número de microorganismos muestra 2, por semana

ANÁLISIS	NÚMERO DE MICROORGANISMOS									
	1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03	1,00E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00E-07	1,00E-08	1,00E-09	1,00E-10
SEMANA 1	140	140	45	7.5	0.7	0.4	0	0	0	0
09/08/2008 16/08/2008										
SEMANA 2	140	140	110	15	1.5	0.4	0	0.3	0.6	0.3
16/08/2008 25/08/2008										
SEMANA 3	110	30	4	15	1.5	0.4	0	0.3	0.6	0.3
25/08/2008 30/08/2008										
SEMANA 4	110	30	4.0	15	15	0.4	0	0	0	0
30/08/2008 09/09/2008										

Tabla XXIII Obtención del número de microorganismos por gramo de suelo contaminado muestra 1, por semana

ANÁLISIS	NÚMERO DE MICROORGANISMOS POR GRAMO DE SUELO									
	1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03	1,00E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00E-07	1,00E-08	1,00E-09	1,00E-10
SEMANA 1										
06/08/2008	1,40E+03	1,40E+04	1,10E+05	1,50E+05	1,5E+05	0,4E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
13/08/2008										
SEMANA 2										
13/08/2008	1,40E+03	1,40E+04	1,10E+05	4,50E+05	7,50E+05	0,7E+06	0,7E+07	0,6E+08	0,70E+09	0,4E+10
20/08/2008										
SEMANA 3										
20/08/2008	1,40E+03	1,10E+04	1,50E+04	2,88E+05	1,44E+05	1,60E+06	1,44E+07	11,5E+08	1,10E+09	0,3E+10
27/08/2008										
SEMANA 4										
27/08/2008	1,40E+03	1,10E+04	2,00E+04	3,00E+05	2,00E+05	0,7E+06	0,7E+07	0,3E+08	0,30E+09	0,00E+00
03/09/2008										
PROMEDIO	1,40E+03	1,25E+04	6,38E+04	2,97E+05	3,65E+05	1,60E+06	2,84E+07	12,4E+08	2,10E+09	0,7E+10

Tabla XXIV Obtención del número de microorganismos por gramo de suelo contaminado muestra 2, por semana

ANÁLISIS	NÚMERO DE MICROORGANISMOS POR GRAMO DE SUELO									
	1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03	1,00E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00E-07	1,00E-08	1,00E-09	1,00E-10
SEMANA 1										
09/08/2008 16/08/2008	1,40E+03	1,40E+04	4,50E+04	7,50E+04	0,70E-05	0,4E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
SEMANA 2										
16/08/2008 25/08/2008	1,40E+03	3,00E+03	1,10E+03	7,50E+04	1,50E+06	0,40E+06	0,00E+00	0,3E+08	0,6E+09	0,3E+10
SEMANA 3										
25/08/2008 30/08/2008	1,10E+03	3,00E+03	1,10E+04	4,00E+04	1,50E+06	1,5E+06	0,00E+00	0,3E+08	0,6E+09	0,3E+10
SEMANA 4										
30/08/2008 09/09/2008	1,10E+03	3,00E+03	1,10E+04	1,50E+05	1,50E+06	0,4E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Tabla XXV Observaciones experimentales de las pruebas realizadas para la identificación taxonómica de los grupos bacterianos degradadores de compuestos hidrocarbonados (muestra 1.1-4.1)

No. muestra	Identificación		Afinidad		Pruebas bioquímicas	
	morfología	agrupación	Gram +	Gram-	Catalasa	Oxidasa
1.1	bastones	bacilos curvos		coloración rojiza-rosada	formación de burbujas	coloración morada
1.2	bastones	bacilos curvos		coloración rojiza-rosada	formación de burbujas	coloración morada
2.1	bastones	bacilos	coloración violeta		formación de burbujas	No se observó reacción
2.2	cocos	colonias rojo-rosadas	coloración violeta		formación de burbujas	No se observó reacción
3.1	bastones	bacilos curvos		coloración rojiza-rosada	formación de burbujas	No se observó reacción
3.2	Cocos	estafilococos, tétradas	coloración violeta		formación de burbujas	No se observó reacción
4.1	cocos	estafilococos, tétradas	coloración violeta		formación de burbujas	No se observó reacción

Tabla XXVI Observaciones experimentales de las pruebas realizadas para la identificación taxonómica de los grupos bacterianos degradadores de compuestos hidrocarbonados (muestra 4.2-10.1)

No. muestra	Identificación		Afinidad		Pruebas bioquímicas	
	morfología	agrupación	Gram +	Gram-	Catalasa	Oxidasa
4.2	cocos	Estafilococos, tétradas	coloración violeta		formación de burbujas	No se observó ninguna reacción
5.1	bastones	bacilos curvos		coloración rojiza-rosada	formación de burbujas	No se observó ninguna reacción
5.2	bastones	bacilos curvos		coloración rojiza-rosada	formación de burbujas	No se observó ninguna reacción
6.1	estafilococos	racimos	coloración violeta		formación de burbujas	coloración morada
6.2	bastones	bacilos curvos		coloración rojiza-rosada	formación de burbujas	coloración morada
8.1	bastones	bacilos	coloración violeta		formación de burbujas	No se observó ninguna reacción
9.1	cocos	racimos	coloración violeta		formación de burbujas	coloración morada
10.1	cocos	racimos	coloración violeta		formación de burbujas	coloración morada

Datos Originales

Tabla XXVII. Observación tinciones de Gram

morfología	Gram +	Gram-
bastones Gram-		positiva
bastones Gram-		positiva
bastones Gram +	positiva	
cocos Gram +	positiva	
bastones Gram-		positiva
cocos Gram +	positiva	
cocos Gram +	positiva	
cocos Gram +	positiva	
bastones Gram-		positiva
bastones Gram-		positiva
estafilococos Gram+	positiva	
bastones Gram-		positiva
bastones Gram+	positiva	
cocos Gram +	positiva	
cocos Gram +	positiva	

Fuente: Análisis experimental

APÉNDICE B

Tabla XXVIII Diagrama modificado de Cowans Steel para identificación de bacterias heterótrofas

tinción Gram (cultivo fresco)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
forma	coco	coco	coco	coco	bastón	bastón	bastón	bastón	bastón	bastón	bastón	bastón	coco
agrupación	racimos	racimos	cadena	tétradas									par
crecimiento aerobio	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
crecimiento anaerobio	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
esporas	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
movilidad	-	-	-	-	-	+0	+0	+0	+0	+0	+0	+0	-
catalasa	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
oxidase									+	+	-	+	+
fermentación de glucosa a ácido o a ácido+gas	-	+	+	+	+	+(0-)	+	-	-	-	+	+	-
O/F									-	O	F	F	O
Micrococcus	X												
Staphylococcus		X											
Streptococcus			X										
Lactococcus			X										
Enterococcus			X										
Leuconostoc			X										
Pediococcus			X	X									
Aerococcus				X									
Lactobacillus					X								
Clostridium						X							
Bacillus							X	X					
Alcaligenes									X				
Pseudomonas										X			
Enterobacterias											X		
Aeromonas												X	
Chromobacterium												X	
Neisseria													X

Fuente: (Referencia 21)

APÉNDICE C

Recuento de bacterias heterótrofas totales en el suelo: Técnica del número más probable.

El suelo constituye un gran reservorio de microorganismos que cumplen sus ciclos vitales mineralizando materia orgánica disuelta y particulada, proceso del que obtienen energía para su metabolismo y materia prima para sus constituyentes celulares.

La biomasa y la producción secundaria bacteriana representan una fracción importante de la producción y biomasa total.

Las poblaciones microbianas son controladas tanto en el agua como en el suelo, por predadores específicos como los protozoos incorporándose así a las cadenas tróficas de los sistemas.

El tamaño de las poblaciones de bacterias son bastante constantes en el agua en donde muestran buena correlación con la concentración de materia orgánica presente. El contenido de materia orgánica en el agua varía entre 1 mg/l en ambientes muy oligotróficos y más de 5 mg/l en ambientes muy contaminados. Existen índices del estado trófico o del grado de contaminación de las aguas basadas en su contenido de bacterias heterótrofas; utilizando estos indicadores los resultados obtenidos del recuento de bacterias pueden aportar información para el conocimiento de un ecosistema y su funcionamiento.

El número de bacterias heterótrofas totales en el suelo se correlaciona más con el contenido de agua del mismo que con la cantidad de nutrientes; habiendo suficiente humedad los nutrientes pasan a ser el factor limitante del crecimiento.

Cualquiera sea el ambiente en el que se desarrollen estas comunidades microbianas, el tamaño de las poblaciones es sumamente dinámico y cambia fácilmente ante las alteraciones fisicoquímicas o nutricionales en las que se desarrollan.

La técnica del número de microorganismos viables mediante el Recuento en Placa es uno de los más usados. En este trabajo de investigación se emplea la técnica de número más probable que es aplicable tanto para muestras de agua como de suelo. Primero se empleará dicha técnica para realizar recuento de microorganismos heterótrofos totales en la muestra del suelo contaminado.

Una vez que se ha obtenido el número característico, se busca en una tabla en la que figuran todas las combinaciones posibles y para las que se ha calculado, mediante un método estadístico, el número más probable de microorganismos presentes en la muestra.

Tabla XXIX. Distribución de Mc Crady (para tres réplicas por dilución)

Número característico	Número de microorganismos	Número característico	Número de microorganismos	Número característico	Número de microorganismos
000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	0,7	221	3,0	321	15,0
102	1,1	222	3,5	322	20,0
110	0,7	223	4,0	323	30,0
111	1,1	230	3,0	330	23,0
120	1,1	231	3,5	331	45,0
121	1,5	232	4,0	332	110,0
130	1,6	300	2,5	333	140,0
200	0,9	301	4,0		

Se ingresa en la tabla con el número característico y se lee el número más probable de microorganismos en el volumen de siembra. En este caso, en el que el inóculo de partida es un gramo de suelo, se refiere el número final al peso seco de la muestra.

	Número característico	N.M.P de microorganismos
Ejemplo 1	310	4,5
Ejemplo 2	322	20

A este número obtenido de la tabla debe multiplicárselo por la **inversa** de la menor dilución en la que se han hallado 3 (+), es decir que corresponde a la dilución de la primer cifra del número característico.

Ejemplo 1: $4,5 \times 10^4$ bacterias/g de suelo

Ejemplo 2: 20×10^1 bacterias /g de suelo

APÉNDICE D

Figura 10 Área de preparación de diluciones y cultivos

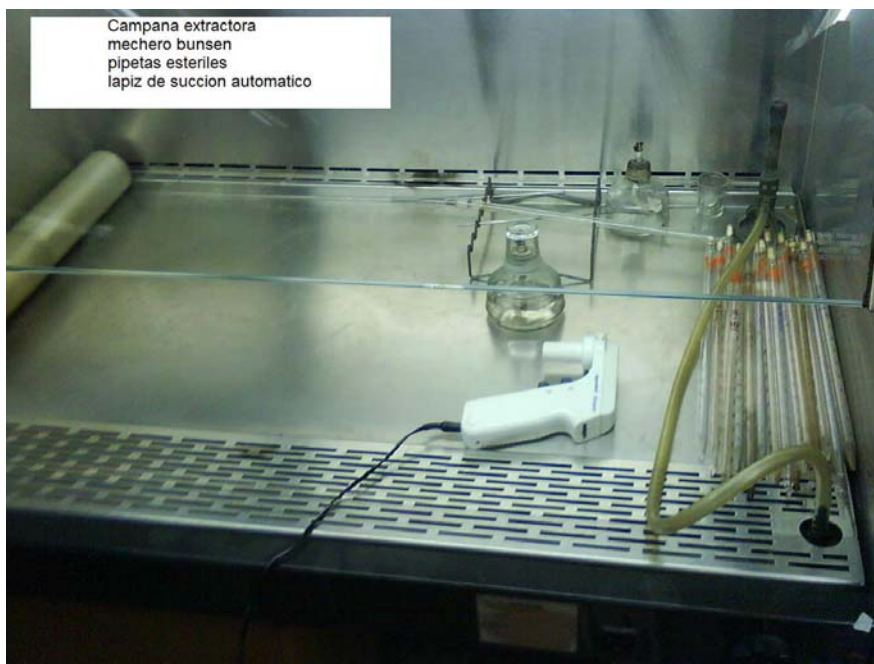


Figura 11. Preparación de las diluciones



Figura 12 Preparación del cultivo en tubos de ensayo con caldo nutritivo



Figura 13 Observación de la evolución de los microorganismos



Figura 14 Rutina de observación semanal de turbidez



Rutina de observacion semanal de turbidez (como indicador de crecimiento microbiano) en los tubos de ensayo.

Figura 15 Resiembras en agar utilizando cajas de petri, paso previo a las tinciones de Gram

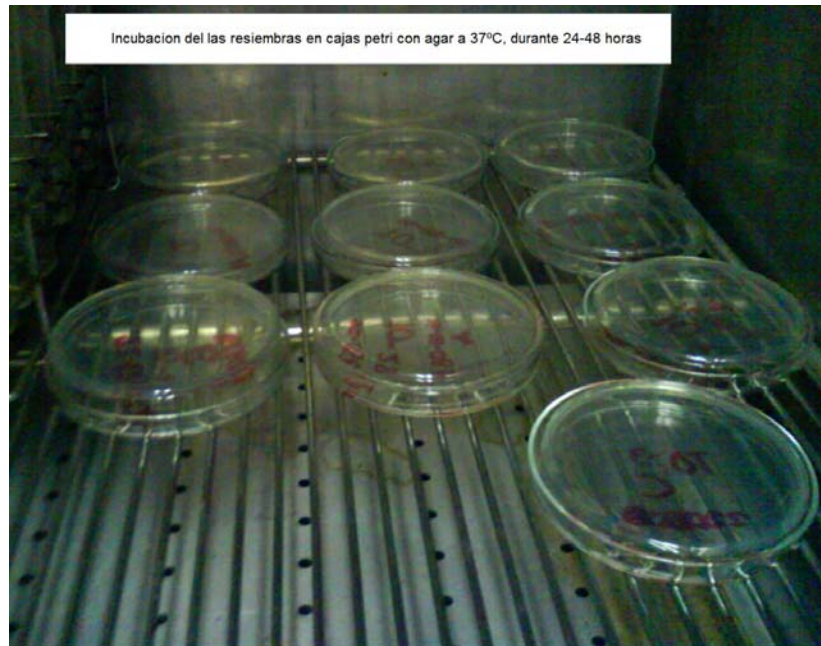


Figura 16 Preparación de los frotis bacterianos



Figura 17 Tinción de Gram sobre el frotis

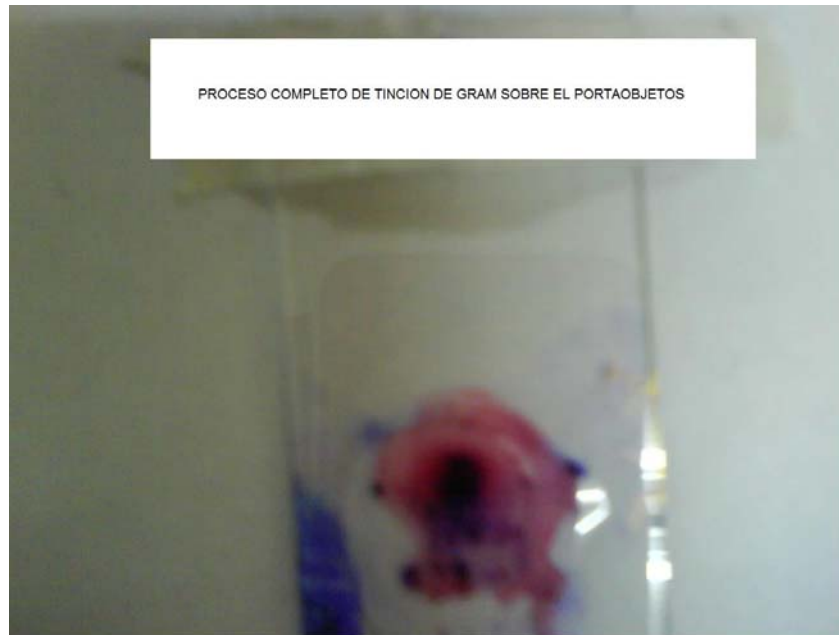


Figura 18 Tinción de Gram y prueba de la catalasa

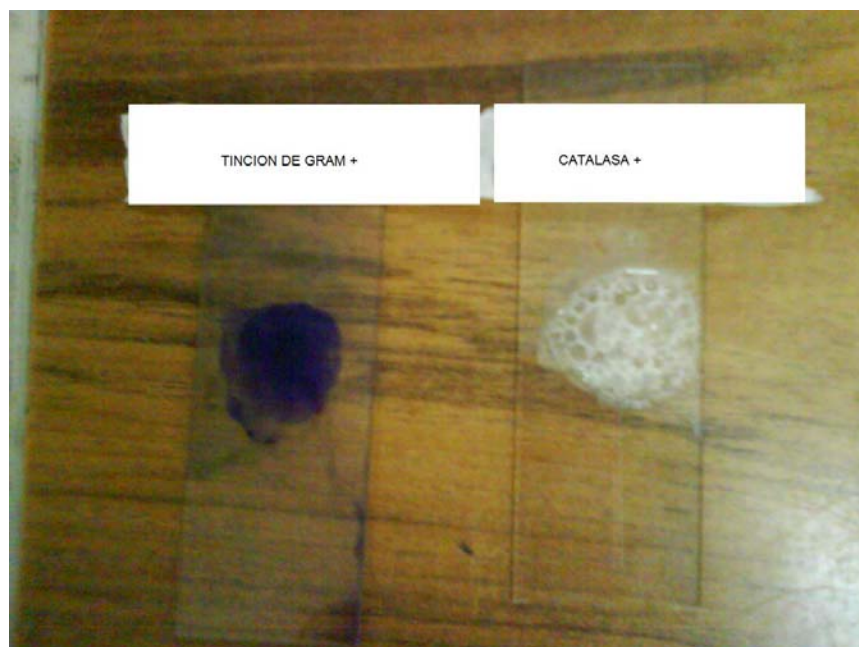


Figura 19 Microscopio electrónico utilizado durante el proceso experimental



Figura 20 Apreciación microscópica de un frotis después de la tinción de Gram

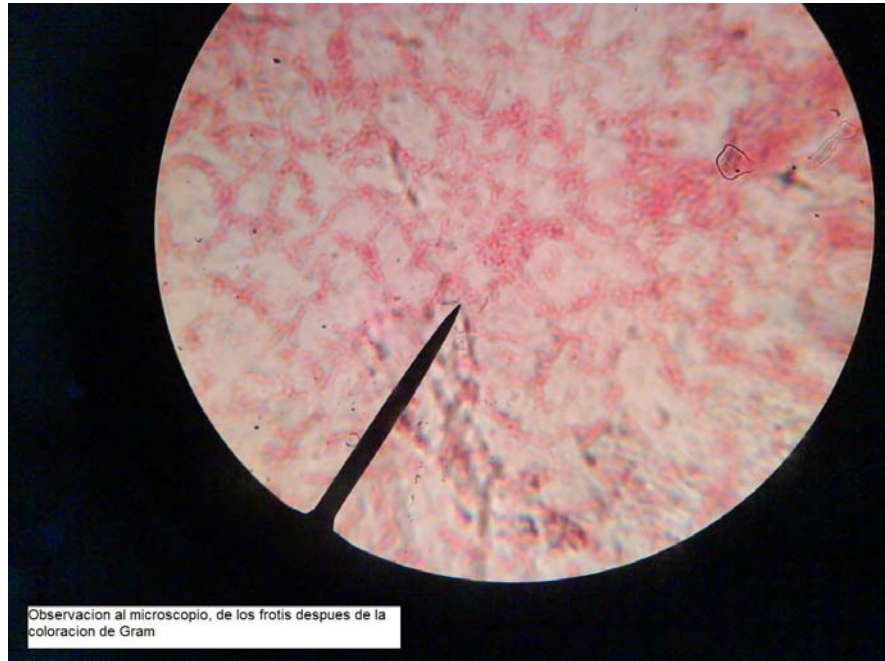
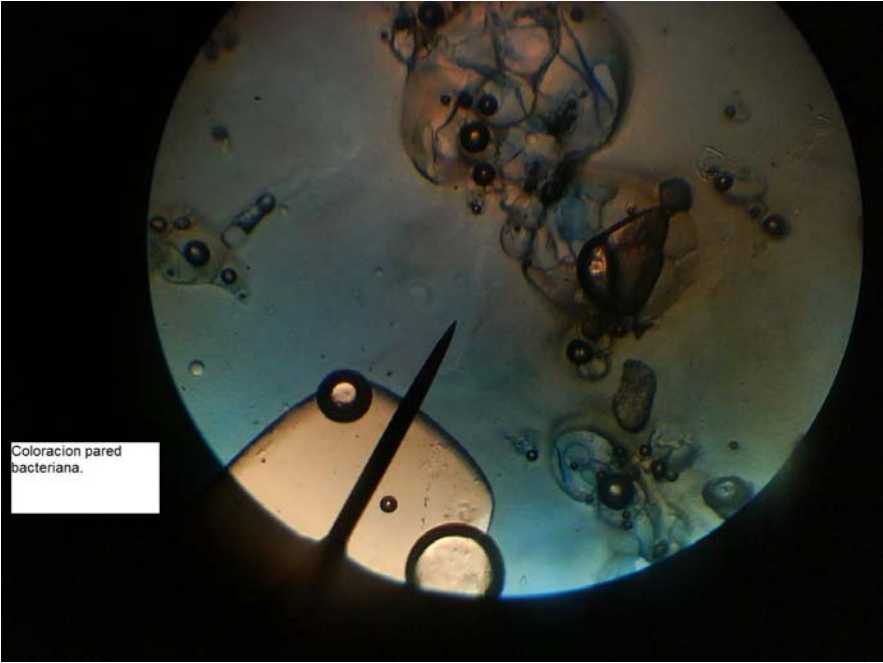


Figura 21 Observación pared bacteriana



APÉNDICE E

Figura 20 Ubicación de las cuencas de explotación petrolera

