



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

**“Caracterización microbiológica en suelos
contaminados por hidrocarburos, de tipo
Pseudomonas en el sector Rio Bonanza, provincia de
Pastaza.”**

PROYECTO DE MATERIA DE GRADUACIÓN

Previa la obtención del título de:

INGENIERO ACUICULTOR

Presentado por:

MARGARITA SOLEDAD MAPOSITA LLAMUCA

CARMEN MARCELA FIALLOS RIVADENEIRA

WILSON OMAR CALLE URGILES

GUAYAQUIL – ECUADOR

2010

A G R A D E C I M I E N T O

A mis padres Miguel A. Maposita y Elvira M^a LLamuca, agradezco su comprensión, perseverancia, su apoyo incondicional y el amor que me expresaron en todo momento, Ellos me han enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad y la fe, ni desfallecer en el intento. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, principios, empeño y una gran dosis de amor.

A mi gran hermano, Ángel por tu gran sentido de ver la vida y diciéndome “hay que ser como los vikingos” gracias por tu apoyo incansable y consejos durante toda mi trayectoria como estudiante y Paul aunque no has estado todo este tiempo a mi lado, me recuerdo los buenos tiempos de nuestra infancia y tus buenos consejos gracias hermano.

Margarita Soledad Maposita Llamuca

AGRADECIMIENTO

Agradezco a La Escuela Superior Politécnica Del Litoral por el valioso conocimiento impartido, a la FIMCM (Facultad Ciencias del Mar), a todos quienes han colaborado en esta tarea, especialmente a mis profesores quienes con sus calores humanos han instado a no flaquear y continuar.

A mis amigos que siempre me han acompañado para llevar a buen término mi carrera universitaria.

Y a mis compañeros de carrera que siempre he podido contar con ellos en todo momento.

Carmen Marcela Fiallos

AGRADECIMIENTO

A mis padres quienes han sabido guiarme y apoyarme durante mi formación académica, a mis hermanos con quienes he compartido aventuras y desventuras. A mis profesores, quienes con paciencia y tenacidad me han inculcado gran parte de mis conocimientos, entre los cuales se encuentran Ecuador Marcillo, Marcelo Muñoz, Jerry Landivar y todos aquellos que no alcanzo a mencionar por lo extensa de la lista. A mis amigos, quienes me han acompañado durante largas jornadas de estudio, compartiendo grandes recuerdos y en quienes he encontrado una segunda familia.

Wilson Omar Calle Urgiles

DEDICATORIA

Me gustaría dedicar esta Tesis a toda mi familia y amigos/as Priscila Triviño y Pamelita Cano que estuvieron preocupadas en que termine este proyecto, a mi primo Juan LLamuca por hacerme el contacto con Vanessa Castro a Stalin Tómalá por ayudarme con mi computadora y estar a mi lado apoyándome, Israel Nogales por ayudarme en lo que necesitara, agradezco a cada uno de ellos que me ayudaron sin pedir nada a cambio y todos mis amigos que empezamos esta carrera.

A Marcela y Wilson mis amigos de este proyecto que hicimos posibles en terminar a pesar de las dificultades que tuvimos

Muchas gracias de todo corazón, nos volveremos a ver.

Margarita Soledad Maposita LLamuca

DEDICATORIA

Dedico este proyecto y toda mi carrera universitaria a Dios, mi Guía, mi Proveedor, sabes lo esencial que has sido en mi posición firme de alcanzar esta meta. Gracias mi Dios por ser quien ha estado a mi lado en todo momento dándome las fuerzas necesarias para continuar luchando día tras día y seguir adelante rompiendo todas las barreras que se me presenten.

Le agradezco a mis padres ya que gracias a ellos soy quien soy hoy en día, fueron los que me dieron ese cariño y calor humano necesario, son los que han velado por mi salud, mi educación, son a ellos a quien les debo todo, horas de consejos , de regaños, de reprimendas de tristezas y de alegrías de las cuales estoy muy seguro que las han hecho con todo el amor del mundo para formarme como un ser integral y de las cuales me siento extremadamente orgulloso. Y en especial a mi hija María Soledad mi angelito de mi vida, que con sus ojitos y cariño me da la fuerza necesaria para estar de pie y con la cabeza en alto para enfrentar cualquier situación por difícil que sea.

Carmen Marcela Fiallos Rivadeneira

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a Dios por haber estado cuidándome y dándome fortaleza día a día. A mis padres quienes me han brindado su apoyo incondicional; sin su perseverancia hoy no fuera la persona que soy.

Wilson Omar Calle Urgiles

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN


M.Sc. Francisca Burgos.

**DIRECTORA DE
PROYECTO DE
GRADUACION**


Ph.D. Marcelo Muñoz.

**DELEGADO DEL
DECANO**

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este proyecto de graduación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”



Margarita Soledad Maposita



Carmen Marcela Fiallos



Wilson Omar Calle Urgiles

INDICE GENERAL

RESUMEN.....I	
INDICE DE FIGURAS.....III	
INTRODUCCION.....IV-V	
CAPITULO 1 INFORMACION GENERAL	
1.1 Caracterización Física.....15	
1.1.1 Ubicación.....15	
1.1.2 Limites.....15	
1.1.3 Vías de Acceso16	
1.1.4 Sistemas Hídricos.....16	
1.1.5 Condiciones Climáticas.....18	
1.1.6 Precipitación17	
CAPITULO 2 DIVERSIDAD MICROBIANA	
2.1 Diversidad Microbiana e Ambientes contaminantes.19	
2.1.1 Biorremediación.....19	
2.1.2 Importancia del Poll microbiano.....20	
2.2. Generalidades de la bacteria degradadora de hidrocarburos..... 21	
2.2.1 Descripción de la bacteria degradadora de hidrocarburos.....21	
2.2.2 Uso de la bacteria degradadora 22	
2.2.3 Degradación de Hidrocarburos alifáticos en presencia de oxígeno...22	
2.2.4 Genero Pseudomonas.....23	
2.3 Hidrocarburos.....24	

2.3.1	Hidrocarburos alifáticos.....	24
2.3.2	Hidrocarburos aromáticos.....	25
2.4.	Medios de cultivos.....	26
2.4.1	Características.....	26
2.4.2	Condiciones requeridas.....	27
2.4.3	Distintos tipos medios de cultivos.....	28
2.4.5	Composición de medio de cultivo.....	28
2.4.6	Tipos de medios de cultivos.....	28
2.4.7	Preparación de medios de cultivos.....	29
2.4.8	Esterilización de medios de cultivos.....	30

CAPITULO 3 AISLAMIENTO DE BACTERIA

3.1	Aislamiento y recuento de bacterias.....	33
3.1.1	Técnica de aislamiento y recuento.....	33
3.1.2	Diluciones seriadas.....	34
3.2	Técnicas de aislamiento de cultivos.....	35
3.2.1	Métodos de identificación bacteriana.....	35
3.2.2	Morfología Celular.....	36
3.2.3	Fisiología.....	36
3.2.4	Bioquímica.....	37
3.3	Método de identificación tradicional.....	37
3.3.1	Prueba oxidasa.....	37
3.3.2	Sistema de identificación API.....	38
3.3.3	Tinciones simples.....	41
3.3.4	Tinciones diferenciales.....	41

CAPITULO 4 IMPACTOS Y METODOLOGIAS

4.1	Principales impactos.....	43
4.1.2	Impacto científico.....	43
4.1.3	Impacto social.....	44
4.1.4	Impacto ambiental.....	45
4.2	Metodologías.....	47
4.2.1	Colecta de muestra.....	47
4.2.2	Identificación de bacterias aerobias.....	48-49
4.2.3	Aislamiento de bacterias degradadoras.....	50
4.2.4	Caracterización de bacterias degradadoras.....	51

CAPITULO 5 PRESUPUESTO.

5.1	Actividades.....	53
5.1.1	Distribución presupuesto.....	56
5.1.3	Cronograma de actividades.....	57
5.1.4.	Resultados esperados y recomendaciones.....	58
5.1.5	Conclusiones.....	58
Anexos	60
Bibliografía	63

RESUMEN

El éxito como resultado de un proceso biológico de descontaminación radica en la degradación de los contaminantes orgánicos y en la reducción de la toxicidad y el potencial de migración de los compuestos peligrosos en el suelo.

Con el fin de buscar aceleradores del proceso de biorremediación de suelos contaminados, un objetivo principal es ejecutar la caracterización microbiológica del lodo-suelo de un río contaminado por hidrocarburos.

En la cual se hace una búsqueda y se selecciona bacterias pseudomonas (del medio) y se aislara cepas de bacterias aerobias, e identificando cepas gran negativa, teniendo como resultado la identificación de géneros comúnmente aislados de suelos contaminados por hidrocarburos.

De los microorganismos aislados, serán capaces de utilizar todas las fracciones del petróleo como única fuente de carbono y energía, lo que hace factible la utilización del lodo-suelo

caracterizado como fuente de microorganismos degradadores de hidrocarburos en el proceso de biorremediación de suelos.

El procesamiento de este proyecto comienza mediante una muestra de suelo con una serie de diluciones, tratando de obtener aquellos morfotipos cultivables; ya que una gran parte de los microorganismos del suelo no pueden ser recuperados en medios para el cultivo de microorganismos.

Además de una búsqueda general, se realiza una específica a través de medios selectivos y diferenciales, en el cual se pretende aislar ciertos morfotipos como ejemplo las *Pseudomona* sp y bacterias lactosa positivas bacterias capaces de utilizar la lactosa, debido a su bien conocida actividad degradadora de hidrocarburos.

La diversidad está determinada por los morfotipos recuperados que se diferencian según su morfología macroscópica su aspecto físico, mientras que la densidad está determinada por el número total de individuos que pertenecen a un grupo con una morfología macroscópica común.

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ubicación del Rio Bonanza.....	18
Figura 2. Repartición en medio de placas.....	30
Figura 3. Diluciones seriadas.....	34
Figura 4. Instrucciones galería api.....	39
Figura 5. Instrucciones galería api (paso 2).....	39
Figura 6. Pruebas Api.....	41

INTRODUCCION

La industria petroquímica es importante en toda sociedad, no obstante, la falta de un programa de protección ambiental hace que el medio se vuelva más frágil ante derrames de petróleo por el deterioro de oleoductos, descargas de efluentes contaminados.

La naturaleza es sabia y así se está probando, tomando en cuenta como está nuestro medio ambiente, en el cual posee una cierta capacidad de limpieza de los elementos contaminantes.

Sucede que existen microorganismos como levaduras, hongos o bacterias que degradan una gran cantidad de sustancias tóxicas, reduciendo su carácter nocivo o, incluso volviéndolas inocuas para el medio ambiente.

La selección de microorganismos a través de pruebas sucesivas de crecimiento poblacional en cultivos puros ricos en petróleo, es una estrategia eficiente para evaluar la adaptación y supervivencia de bacterias tolerantes a elevadas concentraciones de petróleo. Los resultados de estas pruebas confirman la

selección de las bacterias más tolerantes y adaptadas, dependiendo de estas el éxito en las siguientes etapas de tratamiento tanto de suelos como de aguas contaminadas con petróleo.

Es por ello que el presente trabajo tuvo como objetivos fundamentales aislar e identificar bacterias, con capacidad para biodegradar fracciones de petróleo y seleccionar la de mayor capacidad biodegradadora como una alternativa para la solución de los problemas de contaminación generados por este mineral en la industria petrolera ecuatoriana.

Este mecanismo se le conoce como biorremediación, que consiste en acelerar el proceso natural, para mitigar la contaminación ambiental. En otras palabras, se trata del proceso en el que se emplean organismos biológicos para resolver problemas específicos medioambientales, como la contaminación de suelos y aguas.

CAPITULO 1

1. INFORMACION GENERAL

1.1 Caracterización Física, de la Provincia de Pastaza

1.1.1 Ubicación:

Se halla en la Zona central de la Región Amazónica, entre los 75° 35' y 78° 5' de longitud oeste y entre los 1°20' y 2° 35' de latitud sur. Su cabecera cantonal y provincial a la vez se halla localizada a lo 78° 07' de longitud oeste y 1° 30' de latitud sur, a una distancia de 101 Km. A 2H00 de la ciudad de Ambato, 5H00 de la ciudad de Quito y a 3H00 de la ciudad de Riobamba.

1.1.2 Limites:

- Norte: Provincia del Napo.
- Sur: Provincia de Morona Santiago (teniendo como límite natural al río Pastaza)
- Este: República de Perú
- Oeste: Provincia de Tungurahua

1.1.3 Vías de Acceso.

Existen tres vías de acceso que permite llegar hasta la Provincia de Pastaza.

1. El ingreso desde la serranía por la ciudad de Baños por una carretera de primer Orden. Desde Baños la carretera en construcción hasta la parroquia Río Negro.

2. El ingreso desde Macas cabecera cantonal de la Provincia de Morona Santiago se lo hace por una carretera de segundo orden.

3. El ingreso desde Tena hasta el Puyo, se lo hace por una carretera de segundo orden atravesando los cantones de Carlos Julio Arosemena T. y Sta. Clara.

Distancias Terrestres hacia el centro de Operaciones:

- QUITO – PUYO 237 Km
- MACAS – PUYO 129 Km
- TENA-PUYO 79 Km
- AMBATO – PUYO 103 Km

1.1.4 Sistema Hídrico

Los sistemas hidrográficos más importantes del cantón son: Tigre, Bobonaza y Pastaza. El gran sistema del Pastaza de 900 kilómetros de longitud, tiene sus orígenes en el callejón interandino. Recoge las aguas de las hoyas del Patate y Chambo.

Desciende hacia el oriente por desfiladeros y gargantas profundas hasta llegar al salto del Agoyán, en donde sus aguas han servido como generación de energía eléctrica., cruza la cordillera Oriental de los Andes y sale a la Región

Amazónica por la margen izquierda recibe desde el macizo de los Llanganates los ríos como el blanco, el verde, el negro, el topo y el Zúnac. Por la misma margen izquierda recibe al Alpayacu, el Puyo, el Copataza y el Bobonaza que es su más grande afluente.

El Bobonaza es el río más aurífero del país, nace en las alturas de la Cordillera del Siguin y sigue el suroeste hasta unirse con el Pastaza, en sus orillas se encuentran poblaciones como Canelos, Pastaza, Parca yacu, Montalvo entre otras; atraviesa una llanura plana; está formado por el Puruno, Balsaura, etc.

Sistema Hídrico Del Río Bonanza

El Sistema hídrico del Río Bonanza se origina del límite occidental del bloque 23 al margen aluvial del Río pastaza. Este canal principal del río fluye de noroeste a sur-este a través de la parte norte y central del bloque.

El gradiente de este canal varía entre 0.07% y 0.3%. La descarga de este río se estima a 60m³/s

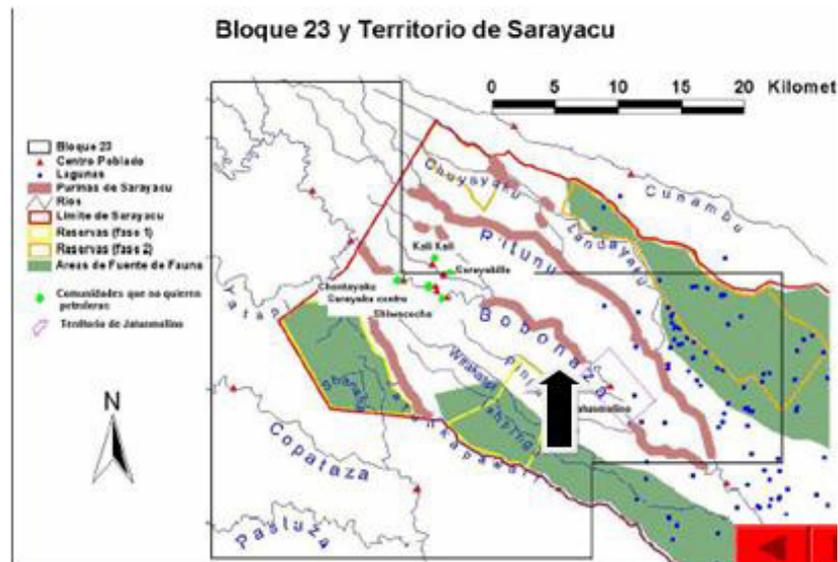


FIGURA 1: Ubicación del Rio Bonanza.

Fuente: <http://www.oilwatchesudamerica.org/docs/sarayaku.pdf>

1.1.5 CONDICIONES CLIMATICAS

- Temperatura máxima 31.0° C y mínima 8.6° C, promedio de 20.3 ° C.

1.1.6 PRECIPITACION

- Precipitación y Humedad al Occidente y Cordillera Oriental 2000 mm. Y en la llanura Amazónica 4700 mm. Promedio anual 4538 mm.
- La evapotranspiración potencial es menor que la precipitación, por lo cual no existe meses secos teniendo una humedad atmosférica promedio anual del 89%.

CAPITULO 2

2. DIVERSIDAD MICROBIANA.

2.1 Diversidad Microbiana en ambientes contaminados.

Diversidad microbiana en ambientes contaminados Los suelos contaminados contienen gran cantidad de microorganismos que pueden incluir un número de bacterias y hongos capaces de utilizar hidrocarburos, que representan un uno por ciento (1%) de la población total de aproximadamente 10^4 a 10^6 células por gramo de suelo.

También, se han encontrado cianobacterias y algas capaces de degradar hidrocarburos. Los suelos contaminados con hidrocarburos contienen más microorganismos que los suelos no contaminados, pero su diversidad microbiana es más reducida.

2.1.1 Biorremediación

La biorremediación es el proceso utilizado por el hombre para detoxificar variados contaminantes en los diferentes ambientes mares, estuarios, lagos,

ríos y suelos usando de forma estratégica microorganismos, plantas o enzimas de estos. Esta técnica es utilizada para disminuir la contaminación por los hidrocarburos de petróleo y sus derivados, metales pesados e insecticidas; además se usa para el tratamiento de aguas domésticas e industriales, aguas procesadas y de consumo humano, aire y gases de desecho.

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. A continuación se enumeran algunas, pero en general no hay una “fórmula secreta” que garantice el éxito de la biorremediación

2.1.2 Importancia del pool microbiano.

La formulación de un pool microbiano permite combinar y complementar sus funciones metabólicas para que colectivamente biodegraden un compuesto. En muchos casos algunos morfotipos sólo pueden realizar una parte de toda una cadena de reacciones químicas para llegar a compuestos que puedan ser fácilmente utilizados por los organismos del mismo consorcio u otros que estén presentes en el ambiente.

Además, al estar en grupo los morfotipos pueden tolerar los cambios físico-químicos que se den en el ambiente durante el proceso de biorremediación.

Cabe aclarar que se necesita un análisis más profundo para la identificación de los morfotipos que serán usados.

2.2 Generalidades de las bacterias degradadoras de hidrocarburos.

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos alifáticos, alicíclicos, y aromáticos se forma procesos químicos a altas presiones y temperaturas y requiere de largos periodos de tiempo. Actualmente constituye un problema debido a que han y siguen ocurriendo una gran cantidad de derrames (aprox. De 1.7 a 8.8 millones de toneladas métricas por año) tanto en mar como en tierra.

Existen pocas alternativas para la limpieza de suelos y aguas que además resulta ineficaces y muy costosas.

2.2.1 Descripción de las bacterias degradadoras de petróleo.

Se les da este nombre a un grupo de bacterias capaces de utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono; la mayoría de las bacterias conocidas hoy en día con esta capacidad fueron aisladas de zonas contaminadas como por ej. Suelos cercanos a refinerías o donde se conozcan derrames de hidrocarburos.

Entre las bacterias más importantes encontramos: ***Pseudomonas***

aeruginosa, *Serratia rubidae*, *Bacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Spirillum sp.*, *Xanthomonas.*, *Alcaligenes sp.*, etc.

2.2.2 Uso de las Bacterias degradadoras de hidrocarburos.

Posible alternativa para la limpieza de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos.

Tipos

Las bacterias degradadoras de petróleo pueden actuar en ambientes **Aerobios** o **Anaerobios**, y que cada caso lo hacen vía diferentes rutas metabólicas. En el caso de los ambientes anaerobios aún no se conoce con gran exactitud que vías metabólicas utilizan; sin embargo en ambientes aerobios las rutas están bien documentadas:

2.2.3 Degradación de hidrocarburos alifáticos en presencia de oxígeno.

Se trata de reacciones de oxidación e hidrólisis y da como producto ácido carboxílico.

2.2.4 Degradación de hidrocarburos aromáticos en presencia de oxígeno.

La vía metabólica se centra en la transformación del catecol; y produce como resultado succinil CoA.

2.2.4 Genero Pseudomonas.

El género *Pseudomonas* está constituido por bacilos Gram negativos, móviles por flagelación polar. Se encuentra normalmente en el suelo y son patógenos oportunistas en animales, plantas y humanos. Entre los microorganismos del género *Pseudomonas* degradadores de hidrocarburos, se encuentra la especie *aeruginosa*, conocida como bacilo pociánico o de pus azul.

Es un bacilo recto o ligeramente curvado, Gram negativo, con olor dulce y aromático debido a la producción de trimetilamina. *Pseudomonas aeruginosa* causa al hombre distintos problemas, pero esta bacteria también tiene diversas aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en el área ambiental.

Así, se sabe que es uno de los pocos organismos capaces de degradar alcanos de cadena ramificada, produce biosurfactantes que son útiles para la limpieza de aguas contaminadas con hidrocarburos y además posee la capacidad de absorber metales pesados tales como Pb, Cr y Zn. Cuando, estas bacterias se adhieren a una superficie, las células se diferencian por formar microcolonias cubiertas por una matriz extracelular que eventualmente llegan a constituir una película.

Las bacterias que forman la biopelícula tienen un metabolismo distinto a las células que crecen en medios líquidos, uno de las diferencias más aparentes es su disminuida sensibilidad a antibióticos y otros agentes tóxicos

2.3 Hidrocarburos.

Los **hidrocarburos** son compuestos orgánicos formados únicamente por átomos de carbono e hidrógeno. Consisten en un armazón de carbono al que se unen átomos de hidrógeno. Forman el esqueleto de la materia orgánica. También están divididos en abiertas y ramificadas.

Los hidrocarburos se dividen en 2 que son aromáticos y alifáticos. Los alifáticos son alcanos, alquenos y alquinos cuyas fórmulas generales son C_nH_{2n+2} , C_nH_{2n} y C_nH_{2n-2} , respectivamente.

2.3.1 Hidrocarburos alifáticos.

2.3.2 Degradación de hidrocarburos alifáticos en presencia de oxígeno

Los hidrocarburos alifáticos los podemos clasificar en alcanos, alquenos y alquinos dependiendo de lo saturados que estén sus enlaces.

Como norma general decir que como más insaturado sea una cadena carbonatada (más dobles y triples enlaces) más difícil o lenta será su degradación. De igual manera los alcanos de cadena larga son más

resistentes a la biodegradación a medida que la longitud de su cadena aumenta.

Cuando alcanzan un peso molecular superior a 500 dejan de servir como fuente de carbono para el crecimiento microbiano. En general también la presencia de ramificaciones reduce la tasa de biodegradación porque los átomos de carbonos terciarios y cuaternarios interfieren con los mecanismos de degradación o lo bloquean totalmente.

Los microorganismos que utilizan hidrocarburos como sustrato deben de tener enzimas denominada monooxigenasas que son dependientes de oxígeno.

La mayoría de los microorganismos en teoría si son capaces de sobrevivir en ese ambiente en ese ambiente pueden degradar sin más problemas hidrocarburos de cadena larga.

2.3.2 Hidrocarburos aromáticos.

Los hidrocarburos aromáticos polinucleares (PAH) son contaminantes muy frecuentes en el medioambiente y que suponen un serio riesgo para la salud humana y para los ecosistemas. El acoplamiento de tecnologías químicas y biológicas en los procesos de biorremediación ha permitido, mediante el empleo de surfactantes, aumentar la biodisponibilidad de estos

contaminantes de carácter hidrófobo a los microorganismos capaces de biodegradarlos.

Por lo general se detallan los mecanismos de biodegradación aeróbica de estos contaminantes y de actuación de los surfactantes para aumentar la biodisponibilidad y, por tanto la biodegradación. Se incluyen algunos estudios seleccionados de la bibliografía. Palabras clave: Biodegradación, biorremediación, PAH, surfactantes.

2.4 Medios de cultivos.

En microbiología, un cultivo es un método para la multiplicación de microorganismos, tales como bacterias y virus, en el que se prepara un medio óptimo para favorecer el proceso deseado. Un cultivo es empleado como un método fundamental para el estudio de las bacterias y otros microorganismos que causan enfermedades.

2.4.1 Características del cultivo.

Un microorganismo se *siembra* en un medio líquido o en la superficie de un medio sólido de agar. Los medios de cultivo contienen distintos nutrientes que van, desde azúcares simples hasta sustancias complejas como la sangre o el extracto de caldo de carne.

Para aislar o purificar una especie bacteriana a partir de una muestra formada por muchos tipos de bacterias, se siembra en un medio de cultivo sólido donde las células que se multiplican no cambian de localización; tras muchos ciclos reproductivos, cada bacteria individual genera por escisión binaria una colonia macroscópica compuesta por decenas de millones de células similares a la original. Si esta colonia individual se siembra a su vez en un nuevo medio crecerá como cultivo puro de un solo tipo de bacteria.

Diferencia entre un medio de cultivo sólido y uno líquido: El medio de cultivo sólido contiene entre 1.5- 2% de agar-agar; el medio líquido no contiene agar-agar.

2.4.2 Condiciones requeridas.

Los medios de cultivo para poder ser utilizados y garantizar que los resultados obtenidos a partir de ellos sean confiables deben cumplir con los siguientes requisitos:

- Disponibilidad de nutrientes
- Consistencia adecuada del medio
- Presencia o ausencia de Oxígeno y otros gases
- Condiciones adecuadas de humedad (mantener en frigorífico)
- Luz ambiental

- pH adecuado
- Temperatura
- Esterilidad

2.4.3 Distintos tipos de medios de cultivos.

El medio de cultivo constituye el aporte de nutrientes indispensables para el crecimiento de los microorganismos.

2.4.4 Composición de un medio de cultivo.

- Componentes indispensables: agua, nutrientes orgánicos (hidratos de carbono, aminoácidos, vitaminas, etc.), nutrientes inorgánicos (P, N, Mg, S, etc.)
- Componentes alternativos: isosmotizantes (NaCl), agente solidificante (agar-agar), tampones, indicadores de pH, etc.

2.4.6 Tipos de medios de cultivo.

- **En función de su consistencia:**
 - Medios líquidos
 - Medios sólidos (en tubo, en placa)
 - Medios semisólidos

En función de su composición:

- Medios complejos (caldo ordinario, extracto de levadura)
- Medios sintéticos

Existen medios de cultivo cuya composición permite el crecimiento de una gran diversidad de microorganismos (agar nutritivo, caldo ordinario). Otros en cambio, se utilizan para la selección de determinados grupos de organismos, o se desarrollan para el estudio de determinadas pruebas fisiológicas o test bioquímicos.

- Medios selectivos
- Enriquecimientos
- Medios para test bioquímicos (utilización de citratos, acidificación a partir de azúcares, etc.).

2.4.7 Preparación y esterilización de medios de cultivo.

Preparación de un medio de cultivo:

- Pesar y disolver los componentes en el medio en el volumen indicado de agua destilada
- Ajustar el pH del medio, si procede
- Para la preparación de medios sólidos se adiciona agar-agar como agente solidificante. Para asegurar la completa disolución del

agar, el medio se calienta hasta ebullición al mismo tiempo que se somete a agitación previamente a su esterilización en el autoclave.

2.4.8 Esterilización de medios de cultivo.

Una vez preparado el medio, éste se debe esterilizar lo antes posible para evitar el crecimiento de microorganismos:

- Medios sólidos en placa - tapar el matraz con tapón de algodón grueso y cubrir con papel de aluminio para llevar a esterilizar en el autoclave (121° C, 15-20 min). Una vez estéril repartir el medio en placas de Petri estériles y dejar en reposo para su solidificación.

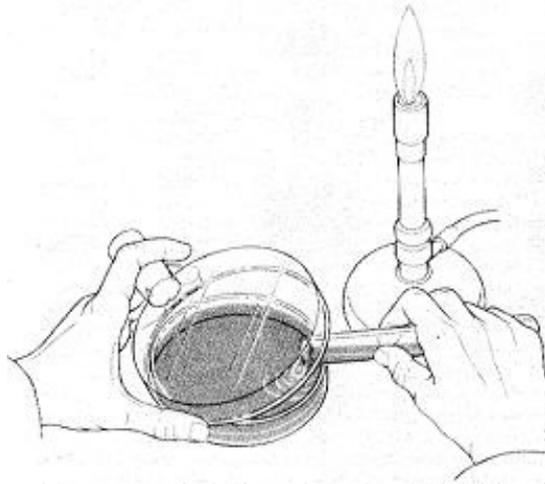


Figura 2: Repartición en medio de placas.

Fuente: <http://egg.umh.es/frvalera/manualDePracticas.pdf>

- Medios sólidos en tubo (agar inclinado) - tras la ebullición del medio con agar, éste se reparte en los tubos de cristal, de forma que queden llenos hasta aproximadamente la mitad.

Los tubos se cubren con tapón (de aluminio), etc.). Para llevar a autoclavar. Una vez esterilizado, los tubos se disponen en posición inclinada para su solidificación.

- Medios líquidos – una vez disueltos los componentes del medio en el matraz, repartir en su caso en tubos a razón de 2-4 ml por tubo, cubrir con tapón y llevar a esterilizar en el autoclave.

Alternativamente, se puede esterilizar el medio en el matraz, y posteriormente repartirlo con la ayuda de pipetas estériles en tubos de plástico estériles.

- Medios semisólidos – se preparan con concentraciones inferiores de agente solidificante (agar-agar). El medio se reparte en tubos. En caso de desear proporcionar condiciones anaeróbicas, existen diversas metodologías para ello. Los medios semisólidos se utilizan para el crecimiento bacteriano a lo largo del tubo. Los niveles de difusión de oxígeno en las distintas capas condicionará el crecimiento de distintos tipos de microorganismos (aerobios, anaerobios).

MEDIOS DE CULTIVOS UTILIZADOS

- **Medio Agar Triptona Soya**

Medio de propósito general para el cultivo de una amplia variedad de microorganismos. Por el contenido de peptona de soya y peptona de caseína resulta una aportación nutritiva que permite el desarrollo óptimo de un gran número de microorganismos

- **AGAR MALTA**

Medio para la detección, aislamiento y enumeración de levaduras y mohos. Se trata de un medio cuya fuente de carbono es el extracto de malta. Recomendado para el aislamiento de levaduras y hongos, resulta pobre para el crecimiento de *Bacillus* sp pero puede servir para la identificación selectiva de algunas cepas.

CAPITULO 3

3.1 AISLAMIENTO Y RECUENTO DE BACTERIAS

3.1.1 Técnica de aislamiento y recuento: Banco de diluciones. Técnica que consiste en obtener una suspensión de la mezcla de microorganismos y hacer diluciones seriadas que se vierten en una placa Petri hasta conseguir colonias aisladas.

Instrucciones: Se debe trabajar, como siempre, en condiciones estériles, flameando la boca de los tubos antes y después de introducir la pipeta, en las proximidades del mechero.

Mediante una pipeta estéril, tomar una muestra del cultivo mixto, y depositar 1ml en el primer tubo con 9ml de suero fisiológico (ó en nuestro caso: 0,5ml en 4,5ml respectivamente) (dilución 10-1).

Agitar hasta conseguir una suspensión homogénea.

Tomar otra pipeta estéril, y transferir la primera dilución 0,1ml al siguiente tubo con 10ml de suero fisiológico (10-2), y así sucesivamente.

A partir del tubo con dilución 10^{-2} y 10^{-4} , con una pipeta estéril, inocular 0,1ml en placa extendiendo la muestra sobre la superficie con el asa de vidrio, la cual se debe esterilizar mediante su introducción en alcohol y posterior flameado, por lo que se pasa el asa impregnada en alcohol por el mechero y se deja consumir el alcohol completamente.

Tras incubar se podrán obtener colonias aisladas. El recuento de estas colonias permitirá conocer el número de células existentes en el cultivo original.

DILUSIONES SERIADAS:

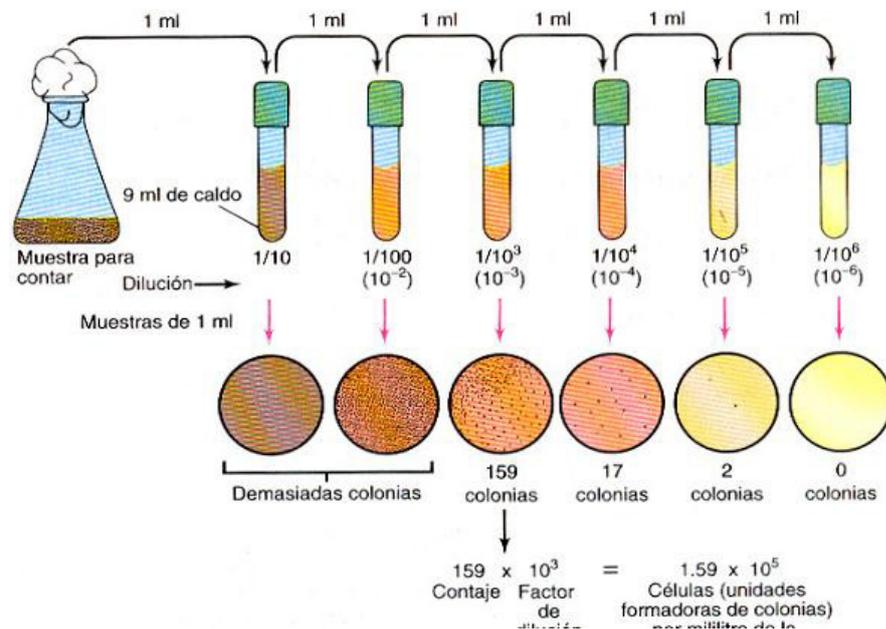


Figura 3: DILUSIONES SERIADAS

Fuente: <http://egg.umh.es/frvalera/manualDePracticas.pdf>

3.1.1 Técnicas de aislamiento para la obtención de cultivos puros.

A partir de un cultivo mixto, se pretende obtener un cultivo puro de bacterias, a través de la obtención de colonias aisladas. Cada colonia representa una población de microorganismos procedentes de una sola célula, a partir de la cual se posee la seguridad de obtener dicho cultivo puro de un solo tipo de microorganismo.

Para ello se utilizan diferentes técnicas de aislamiento, basadas en diluir la muestra inicial para obtener colonias aisladas. Una vez que se ha obtenido un cultivo puro, se puede mantener haciendo resiembras en tubos de agar inclinado o bien congelando las células en glicerol (10-30%) a -70° C, en Nitrógeno líquido a -173° C, o mediante liofilización.

3.1.2 Métodos de identificación bacteriana.

La correcta detección e identificación de los microorganismos presentes en muestras clínicas o de otros orígenes es imprescindible para determinar el origen de las infecciones, seguir el curso de las enfermedades y decidir los tratamientos a aplicar.

Todos los puntos del proceso son importantes, desde la forma de tomar y mantener las muestras hasta su manipulación en el laboratorio.

Se puede decir que en el proceso de identificación de microorganismos se ponen en juego todos los conocimientos acumulados en Microbiología.

La identificación de bacterias puede basarse en muchos caracteres: morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, de tipo serológico y de patogenicidad.

3.2.2 Morfología celular:

- Forma (bacilos, cocos) y agrupamiento (diplococos, racimos, rosarios).
- Tinción (Gram, ácido-alcohol resistentes...)
- Estructuras especiales: flagelos, endosporas

Morfología de las colonias:

- Forma, color, consistencia, borde, sección...

3.2.3 Fisiología:

- Aerobios, anaerobios, anaerobios facultativos
- Temperatura óptima de crecimiento
- Movilidad

3.2.4 Bioquímica:

- Presencia o ausencia de una enzima o de toda una ruta metabólica.
- Fermentación de carbohidratos
- Utilización de citratos como única fuente de carbono

3.3 Métodos de identificación tradicionales.

Identificación de enterobacterias: Como ejemplo, diversos géneros y especies de enterobacterias se identificarán mediante:

- Aislamiento en medio selectivo (MacConkey)
- Tinción de Gram
- Sistema de identificación API
-

3.3.1 Prueba de la oxidasa:

Una varilla de identificación de la actividad oxidasa se pone en contacto con una masa bacteriana de la cepa a ensayar.

3.3.2 Sistema de identificación API.

La batería de pruebas API20E es un sistema de identificación rápida para bacterias de la familia Enterobacteriaceae y otras bacterias Gram(-). Básicamente consta de 23 tests bioquímicos estandarizados y miniaturizados y una base de datos. Este sistema presenta las ventajas de ser rápido, eficaz y de permitir realizar numerosas pruebas a la vez.

Cada tira de API 20E contiene 20 microtubos o pocillos con distintos sustratos deshidratados. Cada tubo es una prueba bioquímica distinta.

Los microtubos se inoculan con una suspensión de microorganismos, en agua o solución salina, que rehidrata los medios. Las tiras se incuban a 37° C y por efecto del metabolismo bacteriano se van a producir cambios de colores espontáneos o bien al añadir reactivos.

La lectura de las reacciones se hace mediante comparación con una tabla de lectura donde se indica si lo siguiente:

- 1.- Se humidifica el sistema mediante adición de agua destilada en los pocillos de la base de plástico transparente.

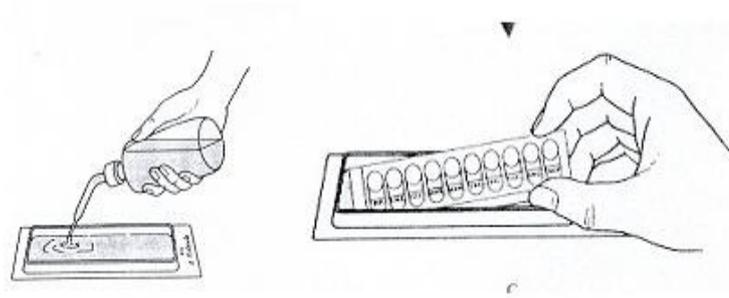


FIGURA 4: Instrucciones galería Api

Fuente: <http://egg.umh.es/frvalera/manualDePracticas.pdf>

2.- Se toma con el asa de siembras una colonia de la cepa a analizar y se resuspende en 5ml de suero fisiológico estéril. Se homogeneiza la suspensión.

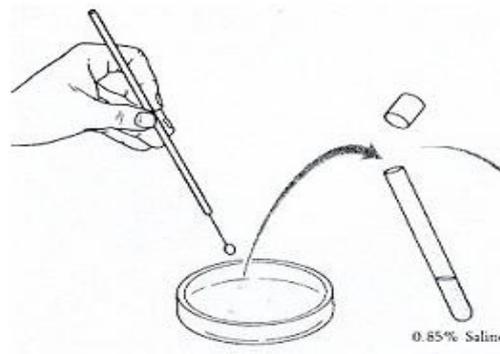


FIGURA 5: Instrucciones galería Api (paso 2)

Fuente: <http://egg.umh.es/frvalera/manualDePracticas.pdf>

3.- Con ayuda de una pipeta Pasteur estéril se rellenan los pocillos del sistema de identificación según las indicaciones. Hasta el borde del tubo en todos los casos excepto:

-En los marcados con el rectángulo abierto [] en los que se rellena también la cúpula (CIT, VP, GEL).

- En el caso de los tubos marcados con subrayado _ (ADH, LDC, ODC, H₂S, URE), se realizará anaerobiosis mediante adición de parafina estéril rellenando la cúpula del tubo (una vez lleno el tubo con la muestra).

Se incuba a 37° C durante 18-24 h

Se observan los resultados de las pruebas bioquímicas en cada pocillo o microtubo:

- Tras observar el resultado de la reacción de fermentación de la glucosa en el tubo GLU (y anotar en hoja de resultados), en este mismo tubo se observa la reacción de reducción de nitratos (mediante la adición de los reactivos NIT-1 y NIT-2 sucesivamente).

- Se adicionan los reactivos indicados en los tubos correspondientes (TDA, IND, VOP-1 + VP-2)

- Los resultados se comprueban en tabla de identificación o programa de identificación.

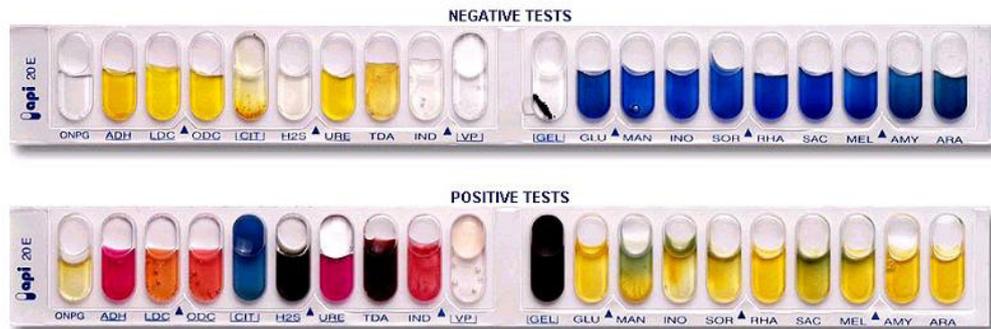


FIGURA 6: Pruebas Api

Fuente: <http://egg.umh.es/frvalera/manualDePracticas.pdf>

3.3.3 Tinciones simples

Utilizan un solo colorante. Se basan en el hecho de que las células tienen una composición química diferente a la de su entorno, de modo que ambos se comportan de forma diferente frente a un colorante. Ejem: Azul de metileno, safranina... etc.

Una vez fijada la preparación (tras esperar que se enfríe), cubrir con el colorante durante 1 minuto, lavar a continuación abundantemente con agua destilada, y secar con papel de filtro. Observar al microscopio.

3.3.4 Tinciones diferenciales

Se basan en el hecho de que distintos tipos de células tienen distinta composición química, y por lo tanto reaccionan de forma diferente frente a una tinción, lo que permite clasificar los microorganismos en diferentes grupos, según su capacidad de tinción. En este apartado están dos tinciones de importancia taxonómica y médica: la tinción de Gram y la de ácido-alcohol resistencia (de Ziehl-Neelsen). Estas tinciones utilizan más de un colorante.

Tinción de Gram: El fundamento radica en la diferente estructura de la pared celular de ambos grupos: las bacterias Gram+ tienen una gruesa capa de

peptidoglicano en su pared, mientras que las bacterias Gram- tienen una capa de peptidoglicano más fina y una capa lipopolisacáridica externa.

Tras la tinción con el primer colorante (Cristal violeta) se efectúa un lavado con etanol que arrastrará al colorante sólo en las Gram (-), mientras que en las Gram (+) el colorante queda retenido y las células permanecerán azules. Las células Gram (-) se teñirán después con un colorante de contraste (safranina) para que puedan observarse.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia o ausencia de bacterias nativas del suelo-lodo, de un río contaminado por hidrocarburos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Aislar bacterias degradadoras de hidrocarburos presentes en las muestras.
- Cuantificar las bacterias presentes en el suelo del sector Rio Bonanza, Provincia de Pastaza.
- Identificar el género de las bacterias aisladas.

CAPITULO 4

4.1 PRINCIPALES IMPACTOS.

4.1.1 Impacto Científico.

Estableciendo la identificación de bacterias en el suelo contaminados por petróleo del Rio Bonanza, en la cual se desarrollara las practicas de biorremediacion, utilizando como hongos, bacterias del medio o bacterias modificadas genéticamente, para neutralizar sustancias toxicas y transformándolas en sustancias menos toxicas para el ambiente o salud

humana. La caracterización bacteriana permitirá el estudio de las bacterias encontradas y a su vez aprovechándolas para diferentes funciones.

4.1.2 Impacto Social.

Esta investigación de cierto modo va encaminada a determinar si es que hay fallas en las leyes ambientales para las operaciones hidrocarburíferas en el Ecuador, para que las autoridades tomen las correcciones necesarias para que mientras se explota el petróleo que es muy necesario para la economía del país, no se llegue a destruir la fauna, con especies únicas, de nuestra amazonia y no se llegue a dañar el ecosistema existente.

La actividad petrolera ha afectado en especial a los pueblos alrededor del Rio Bonanza: Sicona, Secoya, Cofán y quichua, que han perdido gran parte de sus territorios tradicionales y sus posibilidades de sobrevivencia cultural. Sus prácticas están amenazadas por la contaminación de los ríos y la destrucción de los suelos, pérdida de sus cosechas, muerte de animales de caza y pesca y la invasión de colonos.

La colonización en las orillas de los ríos altera las condiciones de vida y reproducción de especies acuáticas.

4.1.3 Impacto Ambiental.

El impacto ambiental deja como un grupo de huellas y problemas que deja en el medio natural, en este caso, las perforaciones petroleras, la contaminación en el aire y ríos, cambios y daños en la flora y en la fauna son claros indicadores de este problema.

Los impactos se dan en todas las fases del proceso como son exploración, perforación, producción, almacenamiento, transporte, procesamiento y distribución de derivados..

Los daños causados por las explotaciones petroleras en la naturaleza se dan en el aire, en los recursos hídricos, en la flora, fauna.

La explotación de hidrocarburos es una actividad cada vez más importante, y su impacto ambiental puede aumentar considerablemente, la tierra amazónica ha sido depredada y envenenada, los ríos amazónicos podrían convertirse en corrientes que llevan cargamentos de basura química, los bosques dejarían de ser una realidad y los animales, tanto como los seres humanos tendrían que emigrar a lugares menos inhabitados, o en su defecto, resignarse a la desaparición lenta e irreversible. Los pueblos indígenas se verían muy beneficiados si el control ambiental para las explotaciones aumentara.

Las empresas responsables del proceso extractivo de energéticos jamás han respetado a la naturaleza de la zona de explotación, éstas deberían parar la contaminación e incrementar la eficiencia de sus operaciones en los campos petroleros existentes mediante la utilización de una tecnología más adecuada. El Estado debe ser el principal garante del derecho a vivir en un ambiente libre de contaminación. Toda iniciativa en beneficio del desarrollo de una cultura ecológica siempre será plausible.

4.2 Área de estudios.

Ubicación: Se halla en la Zona central de la Región Amazónica, entre los 75° 35' y 78° 5' de longitud oeste y entre los 1°20' y 2° 35' de latitud sur. Su cabecera cantonal y provincial a la vez se halla localizada a lo 78° 07' de longitud oeste y 1° 30' de latitud sur, a una distancia de 101 Km. A 2H00 de la ciudad de Ambato, 5H00 de la ciudad de Quito y a 3H00 de la ciudad de Riobamba.

Limites

- Norte: Provincia del Napo.
- Sur: Provincia de Morona Santiago (teniendo como límite natural al río Pastaza)
- Este: República de Perú
- Oeste: Provincia de Tungurahua

Las muestras serán analizadas y preservadas en el Laboratorio de Microbiología de de la Facultad de Ingeniera Marítima y Ciencias del Mar (ESPOL).

Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) Campus Gustavo Galindo que se encuentra localizado en el Km 30.5 vía Perimetral, Provincia del Guayas.

4.3 Metodologías.

- Colecta de muestras.
- Técnicas de dilución y siembra de superficie de placa.
- Conteo y caracterización morfológicos de las bacterias.
- Aislamiento de los microorganismos y obtención de un cultivo.
- Prueba bioquímica Api E20.

METODO

4.3.1 COLECTA DE MUESTRAS:

ISO 10381-6:1993- Calidad de suelo. Muestreo. Parte 6: Líneas directrices para la recogida manipulación y almacenamiento de suelos destinados al estudios en laboratorios de procesos microbiológicos.

Fuente: http://www.biada.org/web/materias/microbiologia/aigua/PDFs/UNE-EN_ISO_5667-13=1998.pdf

4.3.2 Metodología para identificación de bacterias aerobias, hongos, levaduras y bacterias degradadoras (Bergey's (1974). Manual, the Systematic Bacteriology, Volumen I y II)

1. Se pesaron 15 g de suelo del área de estudio.
2. Se añadió a un matraz Erlenmeyer de 250 ml.
3. Agregar 100 ml de medio Solanas (Solana, A.M.1985). Anexo tabla 1
4. Agregar unas 5-10 gotas de tween 80 para facilitar la homogenización.
5. Incubar a 150 rpm durante 30 min.
6. Tomar el sobrenadante.
7. realizar diluciones seriadas en solución salina hasta 10^{-8} (ISO 6887, 1993).tabla 2
8. En estas diluciones se procede a tomar el sobrenadante esta será nuestra solución madre y de ahí partiremos para realizar nuestras diluciones.
9. De las diluciones se retira 1ml por cada uno y sembraran en placas por duplicado en medio de Agar Triptona soya para el conteo total de bacterias aerobias (ISO 4833:1991). Anexo Tabla 3

10. Paralelamente las diluciones se sembraron en placas con Agar petróleo (Finnerty, 1983) para el conteo total de bacterias degradadoras de hidrocarburos. ANEXO Tabla 4

Realizar inoculaciones :

11. Agite la suspensión de la solución madre, solución 10^{-2} , 10^{-4} sumerja un hisopo de algodón estéril en la suspensión, remueva el exceso de líquido del hisopo presionándola contra la pared del tubo.

12. Preparar: 2.6 de agar malta en 80 ml de agua destilada + 4 g de cloruro de sodio al 5%. Anexo tabla 5

12. Se realizaron inoculaciones en Agar Malta con un 5% de Cloruro de sodio para el conteo de hongos filamentosos y levaduras (ISO 7954: 1987).

13. Empezando en la parte superior de la placa con agar malta y cloruro de sodio inocule la superficie con el hisopo frotando en toda la placa y rote la placa aproximadamente 60° y repita el procedimiento de frotado. Rote otra vez la placa. Esto garantizará que el inóculo sea distribuido homogéneamente.

14. Sugerencia técnica: Incube la placa dentro de los 15 minutos siguientes después de haber estandarizado el inóculo.



Figura : Inoculación de la placa
<http://www.paho.org/spanish/ad/thse/ev/04.pdf>

4.2.3 Aislamiento de las bacterias degradadoras de hidrocarburos

(Bergey's (1984). Manual, the Systematic Bacteriology, Volumen I y II)

1. Las bacterias más representativas de la primera metodología se escoge 2-3 placas en Agar petróleo.
2. Se siembra por agotamiento en medio Agar triptona soya.
3. Se prepara el agar triptona soya en la cual se pesa 6.4 g de triptona de soya en 80 ml de agua destilada.
4. Se procede a depositar 20 ml en cada caja petri para luego ser llevado a incubación.

5. Incubar a 37 ° C por 24 h.
6. Para la caracterización cultural se observaran las bacterias al estereoscopio y para definir las características morfológicas tintoriales que se realizara con la tinción de Gram. Anexo tabla 6

4.3.4 Caracterización de las cepas degradadoras.

Hidrocarburos Alifáticos: Para la determinación de la capacidad de utilización de fracciones de hidrocarburos alifáticos del petróleo como única fuente de carbono se añadió:

- 1) Se prepara 1% de queroseno densidad del compuesto Queroseno son de 0.8 g/mL por lo tanto se toma 10 ml de querosene.
- 2) Se toma 10 ml de isoactano con un 10 ml de medio solanas todo esto por separado.
- 3) El medio se inoculó con una asa de cultivo de cepa
- 4) Incubar durante 21 días a 37 °C con indicador de crecimiento.

Hidrocarburos Aromáticos: Para la determinación de la capacidad de utilización de fracciones de hidrocarburos aromáticos se utilizó:

- 1% de Naftaleno (poliaromático) que es igual 1,28 gramos de naftaleno.
- Disolver el naftaleno como es insoluble en agua, se disolvió primero en acetona, 1 gramo de naftaleno por 50 ml de acetona.
- En este caso sería 64 ml de acetona. Y se lo coloco al medio.
- 10 ml de Tolueno (Aromático alquilado) en medio basal Solanas de 20 ml por separado.
- El Naftaleno, como es un sólido insoluble en agua, se disolvió primero en acetona y luego se añadió al medio.
- El medio se inoculó con un asa de cultivo de cepa.
- Incubar durante 21 días a 37 °C con indicador de crecimiento.

Identificación de las cepas degradadoras: A partir de cultivos frescos de las cepas que crecieron en todos los medios de caracterización se inocularon los Kit de identificación (API 20 NE, 2002) para la identificación de microorganismos Gram negativos no enterobacterias

CAPITULO 5

5.1 PRESUPUESTOS

5.1.1 Actividades

N	Actividad	Fecha Inicio	Fecha Fin	Recursos Materiales	Recursos Humanos	Costo de la actividad
1	Toma de Muestras	01/04/2010	02/04/2010	Frasco o funda estériles, guantes, espátulas.	Estudiantes encargados del proyecto.	\$ 60
	Preparación de cultivo	03/04/2010	07/04/2010	Medio Solanas, Solución Salina, Agar Triptona Soya , Agar Petróleo, Agar Malta, Tincion de, caja Petri, Matraz y autoclave, agua destilada	Estudiantes encargados del proyecto.	\$ 873,50

3	Técnicas identificación de bacterias aerobias, hongos, levaduras y bacterias degradadoras	04/04/2010	04/04/2010	Muestra de suelo, Matraz, Medio Solanas, Agar Triptona, Agar Petróleo, Incubadora, gotas de tween, tubos de ensayo, pipetas, cajas petri, solución salina	Estudiantes encargados del proyecto	\$ 11.230
4	Inoculaciones	04/04/2010	04/04/2010	Hisopo, tubos de ensayos, agar malta, agua destilada, cloruro de sodio	Estudiantes encargados del proyecto	\$1.430
5	Aislamiento de las bacterias degradadoras de hidrocarburos	05/04/2010	06/04/2010	Cajas petri, agar petróleo, agar triptona soya, agua destilada, incubadora	Estudiantes encargados del proyecto	\$2.058
6	Tinción de Gram	06/04/2010	06/04/2010	Porta objeto Picela de agua destilada Cristal violeta Safranina Lugol solución de alcohol	Estudiantes encargados del proyecto	\$100

6				Microscopio		\$2400
7	Conteo y caracterización morfológicas de bacterias	07/04/2010	08/04/2010	Microscopio	Estudiantes encargados del proyecto	\$200
8	CARACTERIZACION DE LAS CEPAS DEGRADADORAS Hidrocarburos Alifáticos	09/04/2010	30/04/2010	Queroseno, isoactano, medio Solanas, pipetas, tubos de ensayos, asa, incubadora	Estudiantes encargados del proyecto	\$2939
	Hidrocarburos Aromáticos	01/05/2010	22/05/2010	Naftaleno (poliaromático), acetona, tolueno, medio Solanas, asa, incubadora		
COSTO TOTAL DEL PROYECTO						21.230,22

5.1.1 Distribución del presupuesto

	Aporte CICYT (US\$)	Otros Aportes Institucionales (US\$)	Aporte Externo(US\$)	Total (US\$)
1. Remuneración recursos humanos (<i>Director, Investigadores, Técnicos</i>) ¹ (≤ 25%) En tesis NO APLICA.			3200	3200
2. Viajes Técnicos			1300	1300
3. Capacitación (<i>pasantías, cursos</i>)			800	800
4. Equipos (≤50%)		6000	5230.74	11230.00
5. Libros y Revistas			320	320
6. Materiales y Suministros			1460.22	1460.22
7. Transferencia de resultados			820	820
8. Subcontratos y servicios (≤ 20%)			2100	2100
Total		6000	15230.22	21230.22
Porcentaje		28	72	100

5.1.3 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6	Mes 7
Investigación Bibliográfica	4 semanas	2 semanas					
Investigación de Campo 1	1 semana						
Toma de muestras de pot cosecha			1 semana				
Tiempo de muestras en pre siembra			1 semana				
Análisis de muestras				1 mes			
Análisis estadísticos					1 semana		
Avance						3 semanas	
Revisión							1 mes

RESULTADOS ESPERADOS Y RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar la factibilidad de utilización de proceso digeridos a plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales como fuentes de nutrientes y de microorganismos biodegradadores de hidrocarburos en el proceso de Biorremediación de residuos sólidos petrolizados y suelos contaminados por hidrocarburos.
- Se debe estudiar la posibilidad de obtención de bioproductos y biosurfactantes a partir de las cepas aisladas e identificadas

- Es muy importante mantener el suelo en condiciones aeróbicas, porque la transformación de los hidrocarburos del petróleo en condiciones anaeróbicas es muy lenta o algunas veces inexistente

CONCLUSIONES

- Todos los medios de cultivos que se utilizaron como fuente de crecimientos con diferentes sustratos como única fuente de carbono y energía, estas bacterias tendrán un óptimo crecimiento al final de la incubación, siendo capaces de degradar todas las fracciones de hidrocarburos a la que fueron expuestas, por lo que constituyen que hay microorganismos con diferentes fines degradativos en suelos impactados por hidrocarburos.
- Las bacterias aerobias aisladas e identificadas de nuestra muestra de suelo-lodo del Rio Bonanza serán capaces de degradar todas las fracciones de hidrocarburos, y pueden servir como materia prima para la obtención de bioproductos (inóculos), para ser empleados en suelos contaminados por hidrocarburos y donde no sea posible la aplicación del proceso de Biorremediación por la técnica de la bioestimulación de los microorganismos autóctonos tal es el caso como los manglares.

- El potencial de los microorganismos para la biodegradación se puede obtener de una manera rápida para sólo ver si existen bacterias en un estado activo, o de una manera más a fondo para, además, determinar las condiciones óptimas de biorremediación y aproximar el tiempo requerido para sanear el sitio.
- La biorremediación, es una tecnología, que tiene un gran potencial en la recuperación de sitios contaminados por hidrocarburos de petróleo y generalmente es más barata que otras alternativas de restauración.
- De cualquier modo, se necesita considerar los factores determinantes para un sistema de biorremediación, y se deben entender las limitaciones de esta tecnología y compensarlas.

**ANEXOS
MEDIOS Y COTIZACIONES**

ANEXO 1 : MEDIO SOLANAS

Compuesto		Cantidad
Sulfato de sodio		2 gramos
Fosfato di potasico		0,5 gramos
cloruro de amonio		1 gramo
nitratro de potasio		2 gramos
Sulfato de Hierro II		0,01 gramos
Petroleo crudo		1%
Agua destilada		100 ml

ANEXO 2

SOLUCION SALINA

Compuesto		Cantidad
Clorurro de sodio		100 gramos
agua destilada		10 litros

ANEXO 3

AGAR TRIPTONA SOYA

Compuesto	Cantidad
Peptona de caseina	15 gramos
cloruro de sodio	5 gramos
Agar	15 gramos
agua destilada	1 litro
Peptona de soya	5 gramos

ANEXO 4

AGAR PETROLEO

Compuesto	Cantidad
Cloruro de sodio	24 g
cloruro de potasio	0,7 g
Fosfato diacido de potasio	2 g
Sulfato de magnesio heptadifratado	1 g
fosfato acido disodico	3 g
Nitrato de Amonio	1 g
Agua destilada	100 ml
Petroleo crudo	10 ml

ANEXO 5

AGAR malta

Compuesto	Cantidad
Extracto de malta	30 g
Peptona	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
fosfato acido disodico	3 g
Nitrato de Amonio	1 g
Agua destilada	100 ml
Petroleo crudo	10 ml

BIBLIOGRAFIA

1. ACOSTA , I; INFANTE, C. LOPEZ, W (1995). "Efecto de lodos petrolizados y lodos de tratamiento de aguas servidas sobre un suelo calciorthids de la península de Paraguay". *Agronomía Trop.* 45(4): 527-537.
2. ÁLVAREZ JA, y col. (2004). "Aplicación de la Biorremediación para tratar los residuales sólidos petrolizados de fondos de tanques de la Refinería Níco López." P 2507, E03. CUPET. C. Habana, Cuba.
3. AMENEIROS , J.A, García, O (2003). "Composteo de lodos generados en sistemas de tratamiento de aguas residuales", CIMAB, La Habana, Cuba
4. Api 20 NE (2002). Bio Mérieux SA. 07615B-11/97. 1-5.
5. BERGEY´S (1974). Manual, the Systematic Bacteriology, Volumen I y II
6. BERGEY´S (1984).Manual, the Systematic Bacteriology, Volumen I y II
7. Finnerty, W. R., Schokley, K., and Attaway, H, (1983). Microbial desulphurization and denitrogenation of hydrocarbons. *Microbial Enhanced Oil Recovery*. Penn Well Books, Tulsa, Oklahoma: 83-91
8. ISO 10381 - 6:1993, (1993). (E). International Standard. Guía para la colección, manejo y conservación del suelo para procesos microbianos aeróbicos en el laboratorio.

9. ISO 6887:1993. (1993) (E). International Standard. Microbiology: General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination (1993).
10. ISO 4833:1991(1991) (E). Microbiology-general guidance for the enumeration of microorganism colony count technique at 30 ° C.
11. ISO 7954:1987 (1987) (E) Microbiología: Guía general para la enumeración de hongos y levaduras. Técnica del conteo de colonias a 25 oC.
12. Medegan, MT (1998). Brock: Biología de los microorganismos 8va ed. Madrid, España
13. Ron, E. Z. y Rosenberg, E (2002). Biosurfactants and Bioremediation. Current opinion in biotechnology 13: 249 – 252.
14. Solana, A.M (1985). Biodegradación marina en la contaminación por hidrocarburos. Mundo Científico. 1(8): 913-920.
15. Whyte, L.G., Bourbonnière, L y Greer, C.W (1997). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotropic Pseudomonas strain possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. App. Environ. Microbiol. 62(9): 3719-3723.



LABORATORIOS ASOCIADOS
"ZUMBA" S. A.

MATRIZ GUAYAQUIL: Luis Urdaneta 1602 y José Mascote. Teléfonos: 2286510-2283740-2287941-2394916- 2394886. Fax: (5934)2286371-293947. Casilla 9658. E-mail: zumba@gye.satnet.net , zumba@ma.pro.ec
SUCURSAL QUITO: América 3911 y Rumipamba , Planta Baja. Teléfonos: (02) 2440668-2464251-2464252. Fax: (02) 2440668 (pedir tono). Casilla 4119.

R.U.C. : 0990650381001

Pagina (1)

NOMBRE : ESPOL ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL
DIRECCION: KM. 30.5 VIA PERIMETRAL
R.U.C : 0960002780001
CIUDAD : GYE PROV.: GUAYAS (09)
#. CLIENTE: 1561
TELEFONO : 2269269 269375
VENDEDOR : 105 Carrillo Landin Manolo Fa

ASUNTO: PROFORMA

FECHA: 30/Nov/09

PROFORMA 17148

ITEM	CANT. MED.	DESCRIPCION	PRECIO.U.	PRECIO.T.
001		Balanza Ohaus Adv. Diam. 120	516.00	516.00
002		Vortex agitador Shoker Plataforma 21,7 m	331.80	331.80
003		Incubadora Microbiologica marca Nemme	700.00	700.00
004		Cabinas de seguridad biológica tipo II marca MARcs	3790.00	3790.00

Validez de La proforma: 60 DIAS

Forma de pago : CONTADO CONTRA ENTREGA.

Tiempo de Entrega: INMEDIATA, SALVO VENTA PREVIA.

Subtotal	I.V.A	Flete	total
4697,264	640,536	0	5337.80

Reactivos

Descripcion	Presentacion	Valor
Agar Mueller Hinton	500g	60
Agar Agar	500g	89
Agar Mac conkey	500g	100
Agar Triplicasa Soya	500g	66
Agar nutritivo (TSA)	500g	168
Tincion de Gram	Kit	68
Gotas de Twen	10 ml	84.4
Isooctano	1000 ml	8.20
Naftaleno	100 g	30
Tolueno	100 ml	24.1
Acetona	1000 ml	52.9
Sub Total		822.60

Medio Salino de Solana

Descripcion	Presentacion	Valor	Cantidad Requerida	vu	vtotal
Sulfato de Sodio	500	44.64	2	0.09	0.18
Fosfato di Potasico	100	35.28	0.5	0.35	0.18
Cloruro de Amonio	500	41.64	1	0.08	0.08
Nitrato de Potasio	100	25.08	2	0.25	0.50
Sulfato de Hierro II	250	47.16	0.01	0.19	0.00
1% de Petroleo crudo	1	2.74	0.01	2.74	0.03
Sub Total		196.54	5.52	3.70	0.97

Agar petroleo

Descripcion	Presentacion	Valor	Cantidad Requerida	vu	vtotal
Cloruro de Sodio	500	41.76	24	0.08	2.00
Cloruro de Potasio	500	36.00	0.7	0.07	0.05
Fosfato di Acido de Potasio	500	66.95	2	0.13	0.27
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	500	115.92	1	0.23	0.23
Fosfato Acido di Sodico	1	2.45	0.003	2.45	0.01
Nitrato de Amonio	500	48.24	1	0.10	0.10
Agua Destilada	1	0.95	1	0.95	0.95
Petroleo crudo	1	2.74	0.01	2.74	0.03
Sub Total		315.01	29.713	6.76	3.64

Agar Malta

Descripcion	cantidad de Veni	Valor	Cantidad Requerida	vu	vtotal
Extracto de Malta	100	24.48	30	0.24	7.34
Peptona	500	83.64	5	0.17	0.84
Agar	500	89.00	15	0.18	2.67
Agua Destilada	1	0.95	1	0.95	0.95
Sub Total		198.07	51	1.54	11.80

Equipos

Producto	Precio
Espectofot	3000
Cabina de	3790
Incubadora	700
Vortex	331.8
Autoclave	3000
Balanza	516
Mechero	40.68
pH metro	613.2
Pipeta de 1	47.88
Tubo de Eil	53.4
Asa de Pla	16.32
Caja Petri	12.72
Matraz de	9.5
Vaso de pr	18.48
Juego de B	82.92
Botellas pa	27.84
Sub Total	6260.74

TOTAL 13792.96

Análisis 15 gramos de muestra

Tiempo Estimado: 7 - 8 días

Mano de Obra		480.00
Materiales por proceso		222.06
Reactivos	205.65	
Medio Salino de Solana	0.97	
Agar petroleo	3.64	
Agar Malta	11.80	
servicios basicos		22.46
Utilidad 20% sobre servicio		144.90
PRECIO DEL SERVICIO		869.42

INVERSIÓN EN EQUIPOS**11,230.00**

Producto	Precio
Espectofotometro	2,550.00
Cabina de Seguridad	3,790.00
Incubadora	700.00
Vortex	331.80
Autoclave	2,419.26
Balanza	516.00
Mechero	40.68
pH metro	613.20
Pipeta de 10 ml	47.88
Tubo de Ensayo	53.40
Asa de Platino	16.32
Caja Petri	12.72
Matraz de 250 ml	9.50
Vaso de precipitacion de 1000 ml	18.48
Juego de Espatulas	82.92
Botellas para Muestras	27.84
Sub Total	11,230.00

INVERSIÓN EN MATERIALES**1,460.22**

REACTIVOS

Descripcion	Presentacion	Valor
Agar Mueller Hinton	500g	60.00
Agar Agar	500g	89.00
Agar Mac conkey	500g	100.00
Agar Triplicasa Soya	500g	66.00
Agar nutritivo (TSA)	500g	168.00
Tincion de Gram	Kit	68.00
Gotas de Twen	10 ml	84.40
Isooctano	1000 ml	8.20
Naftaleno	100 g	30.00
Tolueno	100 ml	24.10
Acetona	1000 ml	52.90
Sub Total		750.60

MEDIO SALINO DE SOLANA

Descripcion	Presentacion	Valor
Sulfato de Sodio	500	44.64
Fosfato di Potasico	100	35.28
Cloruro de Amonio	500	41.64
Nitrato de Potasio	100	25.08
Sulfato de Hierro II	250	47.16
1% de Petroleo crudo	1	2.74
Sub Total		196.54

AGAR DE PETRÓLEO

Descripcion	Presentacion	Valor
Cloruro de Sodio	500	41.76
Cloruro de Potasio	500	36.00
Fosfato di Acido de Potasio	500	66.95
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	500	115.92
Fosfato Acido di Sodico	1	2.45
Nitrato de Amonio	500	48.24
Agua Destilada	1	0.95
Petroleo crudo	1	2.74
Sub Total		315.01

AGAR DE MALTA

Descripcion	Presentacion	Valor
Extracto de Malta	100	24.48
Peptona	500	83.64
Agar	500	89.00
Agua Destilada	1	0.95
Sub Total		198.07

**PROYECCION DEL FLUJO DE CAJA
DEL 1 DE ABRIL DEL 2010 AL 31 DE MARZO DEL 2011**

INGRESOS	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO
SALDO INICIAL	0.00	14,070.00	29,400.00	46,078.20	63,808.97	83,083.30	104,009.23	126,174.38	150,230.45	176,309.80	204,044.46	234,095.59
VENTAS	18,000.00	19,260.00	20,608.20	22,050.77	23,594.33	25,245.93	27,013.15	28,904.07	30,927.35	33,092.27	35,408.72	37,887.34
OTROS INGRESOS												
TOTAL	18,000.00	33,330.00	50,008.20	68,128.97	87,403.30	108,329.23	131,022.38	155,078.45	181,157.80	209,402.06	239,453.19	271,982.92
EGRESOS												
(-) PAGOS												
PROVEEDORES	1,700.00	1,700.00	1,700.00	2,040.00	2,040.00	2,040.00	2,448.00	2,448.00	2,448.00	2,937.60	2,937.60	2,937.60
PUBLICIDAD	600.00	600.00	600.00	600.00	600.00	600.00	300.00	300.00	300.00	300.00	300.00	300.00
ROLES	900.00	900.00	900.00	900.00	900.00	900.00	1,200.00	1,200.00	1,200.00	1,200.00	1,200.00	1,200.00
ARRIENDOS	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00
SERVICIOS BASICOS	180.00	180.00	180.00	230.00	230.00	230.00	250.00	250.00	250.00	270.00	270.00	270.00
GASTOS DE CAJA	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	150.00	150.00	150.00	150.00	150.00	150.00
VARIOS	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00
SUB-TOTAL:	3,930.00	3,930.00	3,930.00	4,320.00	4,320.00	4,320.00	4,848.00	4,848.00	4,848.00	5,357.60	5,357.60	5,357.60

TOTAL	14,070.00	29,400.00	46,078.20	63,808.97	83,083.30	104,009.23	126,174.38	150,230.45	176,309.80	204,044.46	234,095.59	266,625.32
--------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------

Representante Legal

Contador General

