

25/07/2024

Potencial biorremediador de comunidades bacterianas en diferentes momentos de contaminación por derrames de hidrocarburos en el Sacha-Ecuador

UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Viviam Ruiz

FO-GDC-138-V.1.0

Página 0 de 12

Contenido

1	Antecedentes (max. 1000 palabras)	2
2	Planteamiento del problema a investigar (máx. 350 palabras)	2
3	Justificación de la investigación (máx. 350 palabras)	2
4	Preguntas de investigación	2
5	Hipótesis	2
6	Objetivos de la investigación	2
6.1	General	2
6.2	Específicos	2
7	Métodos (máx. 1000 palabras)	2
8	Cronograma de actividades (basado en el marco lógico)	2
9	Presupuesto referencial	3
10	Referencias bibliográficas (Formato APA).	3

1 Antecedentes (max. 1000 palabras)

En el medio ambiente existen diferentes tipos de microorganismos que cumplen distintas funciones, una de ellas es la biorremediación, utiliza microorganismos para eliminar contaminantes, siendo la población microbiana autóctona fundamental para la biodegradación, requieren condiciones ambientales óptimas para favorecer el crecimiento microbiano y su actividad degradativa (Aransiola et al, 2024) Estos bichos descomponen sustancias tóxicas como los hidrocarburos tanto en suelos como en aguas subterráneas, transformando las cadenas largas de estas moléculas nocivas en moléculas más simples, de esta forma su descomposición sería más fácil y rápida, para poder disponer de ecosistemas que no den peligro alguno al medio ambiente. (Pinto & Sánchez, 2018)

Existen diversos tipos de microorganismos degradadores de hidrocarburos, estudios demuestran mas de 160 géneros de microorganismos que degradan hidrocarburos los mas usados son: *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* y en menos ocasiones *Mycobacterium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula* y *Candida*, las bacterias son las principales degradadoras de hidrocarburos, son mas usadas que hongos y levaduras. (Braibant, 2004). Esto se debe a que estos microorganismos que habitan en estas superficies se pueden adaptar a parámetros físicos, químicos como es la temperatura pH y humedad que presentan estos suelos con sustancias toxicas utilizándolas como alimento para realizar su metabolismo, por otro lado una de la importancia de estas bacterias es que pueden proporcionar nitrógeno a las plantas. (Ledesma, 2020)

El petróleo está formado por varios tipos de hidrocarburos, son moléculas que contienen átomos de carbono e hidrógeno, se dividen en cuatro: *saturados*, donde se encuentran alcanos; *aromáticos*, como el benceno, tolueno, naftaleno; *resinas*, contienen nitrógeno, azufre y oxígeno por último los *asfaltenos*, moléculas resistentes a la biodegradación, pero el mayor porcentaje de hidrocarburos son degradables. La acción petrolera se realiza principalmente en la Amazonía Ecuatoriana, siendo el lugar con mayor actividad petrolera, esto se debe a la existencia de yacimiento de petróleo, empezando desde el año de 1911, donde se había encontrado fuentes de petróleo en buena cantidad y buena calidad, las zonas específicas de estos hallazgos fueron lugares como Orellana y Sucumbios . En esta región se encuentran grandes cantidades de Hectáreas, 3'051.487,80, siendo este el 26% de toda la Amazonia (Ochoa, 2021)

2 Planteamiento del problema a investigar (máx. 350 palabras)

La contaminación por hidrocarburos es un problema a nivel mundial, ocasiona el deterioro progresivo en el medio ambiente. Dentro del Ecuador las empresas petroleras representan una de las principales fuentes de trabajo, específicamente en la zona norte de la región Amazónica que en la actualidad es la zona con mayor impacto, está conformada por las provincias de Orellana y Sucumbíos, ocupando el primer y segundo lugar en la exploración y explotación petrolera. (Ledesma, 2020) Estas actividades afectan de forma negativa a los suelos, son una amenaza para la salud humana, animal y vegetal, caracterizándose por ser muy persistentes en los ecosistemas. (Conde et al, 2021) Una de las problemáticas es que, los suelos pierdan su actividad de poder fertilizar en la producción agrícola por la falta de uso de métodos de remediación, esto debido a la lenta degradación natural que tiene el petróleo (Ledesma, 2020). También cabe recalcar que la biorremediación muchas veces puede ser muy limitada por la cantidad de especies de microorganismos y por hidrocarburos de alto peso molecular como alifáticos y aromáticos, son contaminantes muy resistentes porque tienen una baja solubilidad, dando como consecuencia una mala disponibilidad de degradar estos compuestos a los microorganismos nativos acumulándose en el medio ambiente. (Conde et al, 2021)

3 Justificación de la investigación (máx. 350 palabras)

La biorremediación es una técnica considerada amigable con el medio ambiente, simple y económicamente accesible. Su propósito es potenciar los procesos naturales de biodegradación ajustándose a los factores que limitan su eficiencia. Este método se basa en un proceso catabólico, transformando moléculas tóxicas en moléculas más simples a través del metabolismo de microorganismos, usando el hidrocarburo como una fuente de carbono, estas comunidades bacterianas que están expuestas al petróleo, pueden adaptarse a este entorno mostrando una evolución genética durante el paso del tiempo dando como resultado un recurso potencial para el saneamiento de sitios contaminados. Frente a la problemática de limitación de especies biorremediadoras, se puede aplicar una estrategia bastante utilizada que es el bioaumentación, este consiste en aplicar o introducir microorganismos para acelerar la degradación del contaminante, esta técnica se usa cuando las comunidades autóctonas no son lo

suficientemente eficientes para degradar sustancias nocivas en un tiempo adecuado o es más lenta de lo esperado

4 Preguntas de investigación

¿Los microorganismos autóctonos presentes en suelos contaminados del campo Sacha- Ecuador tienen un potencial biorremediador significativo para degradar hidrocarburos y cómo varía su diversidad según las áreas de estudio?

5 Hipótesis

Los microorganismos autóctonos de los suelos contaminados del campo Sacha poseen un alto potencial biorremediador para la degradación de hidrocarburos, la reducción de hidrocarburos totales dura de 4 a 6 meses

6 Objetivos de la investigación

6.1 General

Determinar el potencial biorremediador de microorganismos autóctonos en el Sacha-Ecuador

6.2 Específicos

- Identificar microorganismos con potencial biorremediador en suelos contaminados con hidrocarburos.
- Determinar el índice de diversidad por áreas de estudio de bacterias con potencial biorremediador.
 - Determinar la eficiencia de biorremediación de los aislados más diversos identificados en las zonas de estudio en condiciones controladas.

7 Métodos (máx. 1000 palabras)

Muestreo del suelo

La recolección de muestras se llevará a cabo siguiendo la metodología descrita por Mendoza y Espinosa (2017). Consiste en realizar un muestreo de tres áreas cercanas a pozos o bloques de extracción de petróleo en la parroquia San Carlos, Cantón Joya de los Sachas, Provincia de Orellana. Estas zonas habían sido impactadas por derrames de petróleo, acumulando altos niveles de contaminantes. Los puntos de muestreo se

seleccionarán en función del tiempo transcurrido desde los derrames, estableciéndose intervalos de 4 meses, 5 años y 10 años. En cada caso se tomarán tres muestras de suelo a profundidades de 0-10 cm y 10-30 cm dentro de un cuadrante con 5 puntos de muestreo. Estas submuestras se combinarán para formar una muestra compuesta por pozo y profundidad.

Preparación de diluciones

Se siguió la metodología descrita por Chandrapati y Williams (2014) para cuantificar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) bacterianas presentes en las muestras recolectadas. Esta técnica se basa en la preparación de diluciones seriadas cuantitativas, para lo cual se realizarán diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-7} en tubos de ensayo de 40 ml (un total de 42), cada uno con 9 ml de agua peptonada. En el primer tubo de cada serie se incorporará 1 gramo de la muestra correspondiente y a partir de ahí se transferirá un ml al siguiente tubo de manera consecutiva. Todo el procedimiento se llevará a cabo dentro de una cámara de flujo laminar

Procedimiento para siembra en cajas Petri y cuantificación de colonias bacterianas

Siguiendo la metodología de Singh, Dutta y Jamwal (2017) y Torres (2008). Tras realiza las diluciones seriadas en los tubos de ensayo, se llevará a cabo la siembra en cajas petri, utilizando las tres últimas diluciones de cada serie (10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7}). Para esta etapa se usará el medio de cultivo Agar nutriente, adecuado para el crecimiento, aislamiento y recuento de bacterias. La cantidad de medio necesaria se calculará en función del número de cajas petri y muestras para cada repetición (RI-RIII), se preparará el agar Nutriente a una concentración de 28 gramos por 1000L.

Con las diluciones y el medio de cultivo listo se procederá a la inoculación usando micropipetas permitiendo transferir 1 mL de cada dilución a las cajas Petri. Después se añadirá aproximadamente 20 mL del medio de cultivo preparado a cada caja. Para completar el proceso se cubrir las cajas con tapas y realizará movimientos. Las cajas Petri se incubaran a 30 °C y el conteo de colonias se realizarán a las 24, 48 y 72 horas, con un conteo adicional a los 7 días, siguiendo el método de UFC propuesto por Arana (2015). Para calcular las UFC, se utilizara la formula

$$UFC = \frac{(\sum N^{\circ}pm)}{N^{\circ}C} * FD$$

Donde:

UFC: Unidades Formadoras de colonias

$\sum N^{\circ}pm$: Sumatoria del número probable de microorganismos por cada caja Petri. N°C:
Número de cajas Petri

V: Volumen inoculado en la caja Petri

F.D: Factor de dilución

Caracterización morfo-cultural de las comunidades bacterianas de suelos contaminados con hidrocarburos en diferentes periodos de derrames del contaminante

La caracterización morfo-cultural de los aislados microbianos se efectuará mediante el análisis de la apariencia del crecimiento, la forma, la elevación y los bordes de las colonias, siguiendo lo descrito por Guamán, Torres y Nápoles (2016)

Determinación de la diversidad bacteriana en los suelos contaminados con hidrocarburos en los diferentes periodos de los derrames

Tras completar los procedimientos de cuantificación y caracterización morfo-cultural mencionados, se calcularán los índices de diversidad bacteriana basándose en dichas características. La diversidad bacteriana se evaluará utilizando los índices de Simpson y Shannon-Wiener, recomendados por Escalante (2007), ya que estos permiten analizar tanto la riqueza como la abundancia relativa de las bacterias.

Índices de equidad: consideran el valor de importancia de cada especie.

Índices de heterogeneidad: además del valor de importancia, incluyen el número total de especies presentes en la comunidad.

Ambos tipos de índices destacan aspectos como la dominancia o la equidad dentro de la comunidad. Por ello para fines prácticos, se suelen categorizar como índices de dominancia y de equidad.

Índice de Simpson: refleja la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar pertenezcan a la misma especie y se calcula siguiendo la propuesta por Moreno (2001)

$$\lambda = 1 - \sum p_i^2$$

Extracción y Amplificación de ADN de muestras de suelo

Para la extracción del ADN microbiano se utilizará la metodología de Chongshu (2023), empleando el FastDNA® Kit de centrifugación para suelo. Su concentración y pureza se determinará mediante espectrofotometría, mientras que su calidad se evaluará por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para el siguiente paso, la amplificación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA se realizará mediante PCR empleando cebadores como el 338F (5'-ACTCCTACGGAGGCAGCAG-3') y 806R (5'-TACHVGGGTWTCTAAT-3'). La reacción de PCR se manejará con un protocolo que incluye una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos, durante 27 ciclos. Cada ciclo consistirá en 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 45 segundos a 72 °C, con una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Finalmente los productos de PCR serán extraídos de geles de agarosa al 2% y luego purificados con el kit de extracción de gel de ADN AxyPrep, posteriormente se cuantificarán usando el sistema QuantiFluor siguiendo las indicaciones del fabricante. Chongshu & Changzheng, (2023)

Secuenciación del ADN

Para la secuenciación se usará la tecnología de nanopore, se preparará las bibliotecas con adaptadores específicos para lecturas largas y se realizará con el dispositivo MinION que genera datos en tiempo real, es ideal para identificar genes relacionados con la degradación de hidrocarburos. Los datos se procesarán mediante herramientas bioinformáticas para el análisis funcional de genes asociados a enzimas claves Chongshu & Changzheng, (2023)

Análisis filogenético

Después de la secuenciación ya con los resultados en formato fasta, las secuencias se alinearán en el software ClustalW y serán exportados al programa Mega, para la construcción del árbol filogenético se utilizará el algoritmo Neighbor-Joining con el método p-distance con 1.000 repeticiones bootstrap, teniendo en cuenta transiciones y transversiones. Arenas & Gutierrez (2009)

Extracción de materia orgánica soluble, crudo y fraccionamiento

Las muestras se llevarán sometidas a una extracción continua de crudo durante 24 horas en un sistema Soxhlet utilizando como disolvente de extracción diclorometano (350 mL). Después, el solvente se separará del crudo en el rotavapor y finalmente serán secados a temperatura ambiente hasta la siguiente fase. (Pullaguari, 2024)

El fraccionamiento Sara se realizará en una columna abierta utilizando una bureta de 50 ml, esta será empaquetada con algodón tratado previamente como soporte. Como fase estacionaria se utilizara gel de silica (30g) activada en la mufla a 200 °C, posteriormente fue mezclado con hexano hasta terminar el empaquetado de la columna. A continuación, se pesaran aproximadamente ($100 \pm 0,1$) mg de cada muestra en vidrio de reloj y fueron diluidos en 1 mL de n-hexano junto con una pequeña cantidad de gel de sílice hasta conseguir una pasta fácil de manipular, esta fue finalmente añadida en la parte superior de la columna. (Pullaguari, 2024)

La fracción que contiene hidrocarburos saturados será eluida con 60 mL de n-hexano, para la fracción de hidrocarburos aromáticos se utilizará una proporción 9:1 de n-hexano/diclorometano, y para la elución de la fracción de resinas y asfaltenos se usará diclorometano/metanol en una proporción 9:1. La fracción que contiene hidrocarburos saturados se pesó y se diluirá en hexano con el fin de alcanzar una concentración de 20 mg/ mL. (Pullaguari, 2024)

Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Los análisis se realizarán en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de gases acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar modelo Shimadzu QP-2030. Para la inyección se configurarán las siguientes condiciones: la temperatura inicial 250 °C, la programación de temperatura comenzó en 100 °C y ascendió a 305 °C a una velocidad de 2,5 °C/min durante 20 minutos, el tiempo total de análisis será de 54 min. Se inyectarán 1 µl de muestra, el helio será usado como gas portador a un flujo de 1mL/min. Las temperaturas de la interfaz y de la fuente de iones serán de 280 °C y 230 °C, mientras que el del barrido será de 60 – 600 m/z. (Pullaguari, 2024)

8 Cronograma de actividades (basado en el marco lógico)

9 Presupuesto referencial

10 Referencias bibliográficas (Formato APA).

Arana, I. (2015). Enumeración de microorganismos Como abordar y resolver aspectos prácticos de microbiología (pp. 1). España

Aransiola, A., Abioye, O., Madela, N. (2024). Crude oil biodegradation potential of lipase produced by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hydrocarbon contaminated soil. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 26–32

Arenas, N & Gutierrez, A. (2009). Construcción de una filogenia molecular para las especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* basada en los genes ARNr 16S y ARN polimerasa subunidad: *Revista Ciencias de la Salud*, 7(2)

Braibant, C. (2004). Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por *Acinetobacter* sp. Y *Pseudomonas putida* para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados. [Informe de Práctica de Especialidad]. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Chandrapati, S., & Williams, M. (2014). Most Probable Number (MPN).

Chongshu, L & Changzheng, C. (2023). Biodegradation of petroleum hydrocarbons based pollutants in contaminated soil by exogenous effective microorganisms and indigenous microbiome: *El Sevier*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114673>

- Guamán, F., Torres, R., & Nápoles, K. G. M. (2016). Aislamiento y caracterización de rizobios de *Crotalaria* sp. En el sur de Ecuador. *Cultivos Tropicales*. Vol. 37, 3.
- Ibañez Asensio, S., & Moreno Ramón, H. (2019). Procesos formadores de suelo. Ibañez, C., & Fontúrbel, S. P. F. (2004). Composición del suelo Elementos principales del suelo, geodinámica y dinámica de los principales componentes del suelo. (pp. 4-7). La Paz.
- Ledesma, H. (2020). Variación de comunidades bacterianas en suelos contaminados con hidrocarburos en la parroquia San Carlos, Joya de los Sachas, Orellana. [Propuesta de Trabajo de Grado para optar al título de Ingeniero Ambiental]. Universidad Estatal Amazónica.
- Mendoza, R. B., & Espinoza, A. (2017). Guía Técnica para muestreo de suelos.
- Ochoa, M. (2021). Hongos aislados de muestras de asfalto de la cantera de Pungarayacu, Provincia de Napo, Ecuador: un acercamiento in silico a su potencial hidrocarbonoclástico y biotecnológico.. [Tesis]. Universidad Regional Amazónica Ikiam .
- Pinto, D & Sánchez, V. (2018). Bioremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante la utilización de diferentes cepas bacterianas a escala de laboratorio. [Tesis]. Universidad Libre.
- Pinto, D & Sánchez, V. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante la utilización de diferentes cepas bacterianas a escala de laboratorio [Tesis]. Universidad Libre .
- Ponce, D. (2014). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. [Proyecto de título presentado en conformidad a los requisitos para obtener el título de ingeniero civil]. Universidad del Bio Bio.
- Pullaguari, A. (2024). *Análisis geoquímico orgánico molecular de crudos presentes en la Cantera Pungarayacu y su relación con los cuerpos sedimentarios de la Formación Hollín a través de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)*. [Proyecto de investigación previo a la obtención del título de ingeniero en Geociencias]. Universidad Regional Amazónica Ikiam.
- Singh, S., Dutta, U., & Jamwal, A. B. S. (2017). Morpho-cultural and biochemical identification of *Pseudomonas* sp. isolated from the rhizosphere of different vegetable crops and study its efficacy on *Solanum melongena* (Brinjal). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 22.

Torres, R. (2008). Phytostimulatory effect of Rhizobium and Plant Growth Promoting Rhizobacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) interaction Lovaina.

Zambrano, A. (2021). *Modelización de sistemas de tratamiento biológico (biopilas y landfarming) de suelos con hidrocarburos de petróleo*. [Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación previo a la obtención del Título de Ingeniero Químico]. Universidad Central del Ecuador.