



“Cuantificación y Diversidad de bacterias presentes en suelos contaminados con Hidrocarburos en la Amazonía Ecuatoriana”

Seminario de Titulación II **Cristhoper
Bedoya**

UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Contenido

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

1. Antecedentes

Los problemas de contaminación en el ámbito local, nacional e internacional son parte de nuestra vida cotidiana; por tanto, es preocupante la manera en cómo se han ido degradando los ecosistemas de nuestro planeta, y la capa superficial de la corteza terrestre no es la excepción (Martínez et al., 2011). La actividad petrolera en sus diferentes etapas ocasiona contaminación y cambios en el uso del suelo (Suarez, 2013). La fuente más importante de la economía del Ecuador es la exportación de crudo y derivados que en los últimos 10 años ha oscilado entre un 43 y 66% del total de exportaciones del país y entre un 43 y 59% del presupuesto general del Estado (Pazmiño, 2017). Durante estos últimos 25 años se ha registrado al menos 1.983 derrames de petróleo en la región Amazónica, siendo este último registrado en el sector Piedra Fina de la provincia de Napo. El petróleo es un líquido espeso, inflamable, de color amarillo a negro, que contiene una mezcla de productos químicos orgánicos, la mayoría de los cuales son hidrocarburos (compuestos orgánicos constituidos, solamente, por hidrógeno y carbón). Puesto que el petróleo es un material natural, puede ser diluido o descompuesto por bacterias y otros agentes naturales. Sin embargo, los productos refinados del petróleo (gasolina, kerosén, asfalto, aceite combustible, y otros productos petroquímicos) no son naturales. Debido a esto, existen pocos agentes naturales, como bacterias, capaces de descomponerlos (Hidalgo, 2009).

Los derrames de petróleo ocasionan efectos importantes sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, cambios que a su vez ejercen un efecto directo sobre las poblaciones de microorganismos existentes en el mismo. El impacto puede ser mayor al alterar el equilibrio de las condiciones ecológicas originales (Vázquez et al., 2011).

Estos efectos obedecen a las características propias de los diferentes hidrocarburos que constituyen el petróleo, tales como su:

- 1) **Toxicidad:** Los hidrocarburos aromáticos de bajo punto de ebullición son letales para casi todos los organismos terrestres y marinos. Algunos de los hidrocarburos parafínicos son menos tóxicos y hasta no tóxicos para los seres vivos.
- 2) **Solubilidad:** Los hidrocarburos de alto peso molecular son insolubles en agua; por lo tanto, cuando hay derrames causan problemas porque se adhieren a los organismos y les causan asfixia. En cambio, los derivados del benceno y los naftalenos pueden solubilizarse en agua. Dicha solubilidad influirá en su toxicidad en el ecosistema.
- 3) **Biodegradación:** está en función de las características y peso molecular de sus componentes. En aquellos de peso molecular alto, su tiempo de descomposición es muy largo.
- 4) **Volatilidad, densidad y actividad superficial:** definen cómo cada componente del petróleo se evaporará, hundirá o dispersará.
- 5) **Carcinogenicidad:** No todos los hidrocarburos son peligrosos, si comparamos los alifáticos contra los aromáticos, de acuerdo con la IARC, 2015 (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer), se ha clasificado a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en grupos, de acuerdo con su potencial cancerígeno para los humanos (Barois et al., 2018).

Lo anterior provoca la disminución de poblaciones microbianas importantes para la asimilación y reciclado de nutrientes dentro de los ciclos biogeoquímicos, como es el caso de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre. El nitrógeno es uno de los principales nutrientes para los organismos vivos y en su ausencia limita la producción de alimentos. La mayoría de las transformaciones del nitrógeno en el suelo ocurren a través de microorganismos, cuyos mecanismos dependen de la influencia de factores abióticos, como la concentración de oxígeno, de nitrógeno inorgánico y el pH (Vázquez et al., 2011). Una herramienta para solucionar este problema ambiental es el uso de microorganismos naturales para degradar o descomponer sustancias que son contaminantes y convertirlas en otras menos

tóxicas o inocuas para el medio ambiente. Esta herramienta biotecnológica se llama biorremediación y es una tecnología emergente que utiliza organismos vivos (plantas, algas, hongos y bacterias) para absorber, degradar o transformar los contaminantes y retirarlos, inactivarlos o atenuar su efecto en el suelo, el agua y el aire. La técnica puede ser empleada para atacar contaminantes específicos del suelo, por ejemplo, en la degradación bacteriana de compuestos organoclorados o de hidrocarburos (Rodríguez-Gonzales et al., 2022).

La importancia de los microorganismos en ambientes naturales deriva de su cantidad, diversidad y, sobre todo, de su gran espectro de actividades que, en la mayoría de los casos, repercuten en los seres superiores con los cuales comparte un determinado hábitat.

Concretamente en el suelo, los microorganismos desarrollan una amplia gama de acciones que inciden en el desarrollo y nutrición vegetal (Acuña et al., 2006). Los métodos de identificación en la microbiología tradicional basados en la caracterización fenotípica y bioquímica, han contribuido de forma significativa a diversos campos como la medicina moderna y a la bioprospección biotecnológica (Gregorio, 2019). La diversidad microbiana de los metagenomas se ha analizado mediante el uso del gen 16S rRNA, que codifica para el ARN ribosómico que conforma la subunidad pequeña de los ribosomas. Este gen comprende regiones conservadas y variables en bacterias y arqueas. El gen 16S rRNA se ha utilizado como marcador molecular, ya que permite clasificar a las bacterias y arqueas en grupos taxonómicos de acuerdo con las familias o géneros (Cortés-López et al., 2020).

En la presente investigación se cuantificará y diversificará morfo-culturalmente, bacterias presentes en suelos ya contaminados con petróleo, además se planteará camino a futuras investigaciones las cuales busquen emplear estas bacterias para estudios de biorremediación. Dado que las bacterias habitan en todo tipo de hábitat, se cree que estas se adaptaron en estos suelos contaminados y así mismo se alimentan del residuo de petróleo presente.

2. Planteamiento del problema a investigar

El consumo de energía en el mundo ha aumentado de manera continua, siendo abastecido principalmente por el carbón mineral, el petróleo y el gas, teniendo estos últimos una importancia cada vez mayor para satisfacer las necesidades energéticas de todos los países del mundo (Rojas, 1958).

Ecuador es el cuarto productor de hidrocarburos en América Latina y también es conocido por ser el país que acoge la biodiversidad más densa del planeta en referencia a su superficie (Dangles, 2009). Los productos petroleros representan el 56,8% de las exportaciones totales del país y el 67,41% de las exportaciones de materias primas⁶ (BCE, 2013 (a)).

En la década de los cincuenta, comienza la explotación petrolera en una gran extensión de tierra en la zona norte de la Región Amazónica que en la actualidad es la zona de mayor incidencia y está conformada por las provincias de Orellana y Sucumbíos. Estas provincias se convierten en las pioneras en las actividades de exploración y explotación petrolera (a nivel de país, hoy las provincias de Orellana y de Sucumbíos ocupan el primero y segundo lugar, respectivamente) (Vogliano, 2009).

Muchos lo odian, otros tantos lo veneran, pero ninguno puede vivir sin él. Para algunos el petróleo es el “oro negro”, o la “corriente sanguínea de la economía mundial”, para otros es el “excremento del diablo”, “sangre de dinosaurios” (Romero & Vera, 2018).

Petroecuador registró al menos 1.983 derrames de petróleo en la región amazónica entre 1995 y 2011, lo cual equivale a un derrame cada tres días a lo largo de 17 años. En este período, la estatal petrolera derramó más de 125.000 barriles de petróleo (de Almeida et al., 2021). Como consecuencia de estos impactos, el suelo ha presentado deficiencia en cuanto a su fertilidad en la producción agrícola y piscícola de la zona, debido a la falta de conocimiento en el manejo y aplicación de métodos de remediación (Kingston, Little, & Harkantra, 2000). Esto se origina principalmente porque en la región Amazónica Ecuatoriana no se ha considerado las funciones, ni las variaciones de las de las comunidades bacterianas en suelos contaminados con

hidrocarburos, el aumento o disminución de la cantidad de bacterias en el suelo en diferentes periodos del derrame, su diversidad y el efecto que el contaminante genera en el crecimiento de las mismas.

3. Justificación de la investigación

El suelo es un recurso importante para el desarrollo de actividades que satisfacen las necesidades humanas (agricultura, ganadería, avicultura, piscicultura, etc.), también posee capacidades de vital relevancia con el ambiente. Las bacterias son partícipes en estas y otras funciones y constituyen el grupo más abundante de organismos unicelulares procariontes en la naturaleza, Lidya (2018) añade, la influencia de éstas en los flujos de energía, transformación de la materia orgánica, producción de metabolitos, interacciones biológicas, agentes degradadores de contaminantes y ciclos biogeoquímicos. Además, la fijación de algunos de los nutrientes fundamentales en la fertilidad del suelo.

Según las investigaciones los Hidrocarburos son micro contaminantes peligrosos y altamente resistentes a la degradación. Entre las técnicas empleadas para la remediación de suelos contaminados con Hidrocarburos está el uso de tecnologías biológicas que hoy en día ya está cobrando un gran interés. Es por esto que la presente investigación sobre el conocimiento de las variaciones numéricas, la diversidad y el efecto que provoca el suelo contaminado con hidrocarburos en las comunidades bacterianas, contribuiría a futuras investigaciones que beneficien a la Región Amazónica Ecuatoriana con mayor presencia de petroleras.

4. Preguntas de investigación

- ¿Qué géneros o especies bacterianas predominan en suelos contaminados por hidrocarburos en la Amazonia Ecuatoriana?
- ¿Cuáles son las principales bacterias degradadoras de hidrocarburos presentes en estos suelos?

- ¿Cómo varía la biodiversidad bacteriana en función del tiempo transcurrido desde el evento de contaminación?
-

5. Hipótesis

La adaptabilidad de las bacterias presentes en suelos contaminados con hidrocarburos a lo largo del tiempo se manifiesta en cambios de diversidad y abundancia. Se plantea que, en los primeros meses tras la contaminación, la diversidad bacteriana es menor debido a un periodo inicial de adaptación, pero aumenta progresivamente a medida que las bacterias mejor adaptadas proliferan, favoreciendo la presencia de comunidades especializadas en la degradación de hidrocarburos. Asimismo, los suelos previamente expuestos a contaminantes muestran una respuesta microbiana más rápida y eficiente en comparación con suelos contaminados por primera vez, sugiriendo un proceso de selección natural y adaptabilidad. Además, con el tiempo, la comunidad bacteriana podría experimentar una sucesión ecológica, pasando de condiciones aerobias a condiciones anaerobias, lo cual refleja cambios en la composición química del suelo. Estos procesos, influenciados por factores ambientales y la presión selectiva, resaltan la importancia del tiempo en la adaptación y evolución funcional de las bacterias en ecosistemas contaminados.

6. Objetivos de la investigación

6.1 General

- Determinar la variación de unidades formadoras de colonias (UFC) y diversidad de bacterias existentes en suelos contaminados por Hidrocarburos desde 4 meses, 5 y 10 años en la región Amazónica Ecuatoriana.

6.2 Específicos

- Caracterizar morfo-culturalmente las comunidades bacterianas de suelo contaminadas con hidrocarburos.

- Evaluar el efecto del momento de derrame de hidrocarburos sobre la cuantificación y cinética de crecimiento de comunidades bacterianas.
- Determinar la diversidad de bacterias de los suelos contaminados con hidrocarburos en los diferentes momentos de derrame.

7. Métodos

7.1. Localización y muestreo del suelo

Los diferentes puntos o áreas para la recolección de muestras para este estudio se encuentran en la parroquia San Carlos, perteneciente al cantón Joya de los Sachas, misma que limita al norte y este con La Joya de los Sachas, al sur con el río Napo, oeste con la parroquia San Sebastián del Coca, posee una superficie de aproximadamente 13437,41 km². Esta parroquia ha sido seleccionada debido a que la provincia de Orellana se encuentra en el listado de cantones con mayor número de pozos por distancia entre ellos. En esta parroquia se han perforado aproximadamente 76 pozos, de los que el 93,37 % están en producción y el porcentaje restante corresponden a pozos inyectoros, así como también se registran 85 piscinas y pasivos ambientales, datos pertenecientes a petroleras de servicio público.

Para la delimitación de las tres zonas de estudio, se utilizará de herramientas Google Earth, ArcGis y bases de georreferenciación de ArcGlobe. Las tomas de muestras se realizarán mediante la metodología propuesta por Espinoza (2017), esta consistirá en el muestreo en tres zonas cercanas a un pozo o bloque de extracción de petróleo ubicadas en la parroquia de San Carlos, cantón Joya de los Sachas provincia de Orellana mismas que por varios años recibieron por varios años derrames de petróleo.

Para esta investigación se definirá derrames ocurridos en diferentes lapsos de tiempos los cuales serán de 4 meses, 5 años y 10 años, para ello se procederá a tomar 3 muestras de suelo con profundidades de 0-10 cm y de 10-30 cm, en un cuadrante de con 5 puntos distintos, convirtiéndose en submuestras para formar por cada pozo y profundidad una muestra compacta. Las muestras se

conservaran en bolsas ziploc en refrigeración, mismas que serán trasladadas al laboratorio de microbiología de la Universidad Regional Amazónica Ikiam.

7.2. Aislamiento y caracterización morfo-cultural de las comunidades de bacterias

Para la preparación de las diluciones (NMP) se utilizará la metodología propuesta por Williams (2014) con la finalidad de cuantificar las UFC existentes en las muestras recolectadas. Esta metodología consiste en la realización de diluciones cuantitativas seriadas, para ello se procederá a realizar diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-7} en tubos de ensayo de 40 ml (42 tubos de ensayo), los que contendrán 9 ml de agua peptonada. En el primer tubo de ensayo de cada serie se añadirá 1 gramo de cada muestra, para posteriormente añadir 1 ml de ésta al siguiente tubo respectivamente. Este procedimiento se realizará en condiciones estériles en la cámara de flujo laminar.

Una vez realizadas las diluciones en serie en los tubos de ensayo, se realizará la siembra en cajas Petri utilizando las 3 últimas diluciones de cada serie (10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7}), según la metodología propuesta por Singh, Dutta, and Jamwal (2017) y Torres (2008).

Para las siembras en las cajas Petri se utilizará el medio de cultivo Agar Nutriente, siendo este un medio general propicio para el crecimiento, aislamiento y recuento de bacterias. Se calculará la cantidad de medio a utilizar según el número de cajas Petri y muestras por cada repetición (R I-R III), según los valores establecidos por el fabricante.

Al tener ya preparadas las diluciones y el medio de cultivo, se realizará la inoculación utilizando micro-pipetas para facilitar la absorción de 1 ml de cada dilución y el depósito en las cajas Petri. Seguidamente se colocará el medio de cultivo preparado, aproximadamente 20 ml por cada caja. Para finalizar el proceso se cubrirá la caja Petri con la tapa y se efectuaron movimientos en cuatro cuadrantes que permitiera lograr un crecimiento homogéneo y puntiforme de las comunidades bacterianas.

Las cajas Petri se incubarán a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y las colonias se cuantificarán en 24, 48 y 72 horas, después de este último conteo el próximo se realizará a los 7 días de su siembra según el método de UFC propuesto por Arana (2015). Para calcular el UFC se aplicará la siguiente fórmula:

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

Donde:

UFC: Unidades Formadoras de colonias

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

$N^{\circ}C$: Número de cajas Petri

V: Volumen inoculado en la caja Petri

F.D: Factor de dilución

7.3. Caracterización morfo-cultural de las comunidades bacterianas.

La caracterización morfo-cultural de los aislados se llevará a cabo en base a la observación de la apariencia del crecimiento microbiano, forma de la colonia, elevación de la colonia, color y bordes de la colonia (Guamán, Torres, & Nápoles, 2016).

7.4. Determinación de la diversidad bacteriana

Terminados los procedimientos tanto de cuantificación y caracterización morfo-cultural mencionados anteriormente, se realizará los cálculos de la diversidad bacteriana, teniendo como base las características morfo-culturales.

La diversidad bacteriana se determinará a través de los índices de diversidad Simpson y Shannon-Wiener como recomienda Escalante (2007), ya que estos permiten evaluar la riqueza y abundancia relativa de las comunidades bacterianas.

Peet (1974) clasificó estos índices de abundancia en índices de equidad, aquellos que toman en cuenta el valor de importancia de cada especie, e índices de heterogeneidad, aquellos que además del valor de importancia de cada especie consideran también el número total de especies en la comunidad. Sin embargo, cualquiera de estos índices enfatiza ya sea el grado de dominancia o la equidad de la comunidad, por lo que para fines prácticos resulta mejor clasificarlos en índices de dominancia e índices de equidad.

- **Índice de Simpson**

Manifiesta la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean de la misma especie y se calcula mediante la siguiente fórmula (Moreno, 2001):

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

Dónde:

λ : Índice de Simpson

$\sum p_i$: Sumatoria de la abundancia proporcional de la especie (i) es decir, el número de individuos de la especie i dividido entre el número total de individuos de la muestra.

El valor de λ se encuentra acotado entre 0 y p_i , tiende a cero en comunidades poco diversas (Soler, Berroterán, Gil, & Acosta, 2012).

- **Índice de Shannon-Wiener**

Expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra y se calcula a través de la siguiente fórmula (Moreno, 2001):

$$H' = - \sum p_i * (\ln(p_i))$$

Dónde:

H' : Índice de Shannon-Wiener

$\sum p_i$: Sumatoria de la abundancia proporcional de la especie (i)

Ln: Logaritmo natural

El valor de H' varía de 0 y $\ln(p_i)$, tiende a cero en comunidades poco diversas (Ferriol Molina & Merle Farinós, 2012). En la mayoría de los ecosistemas naturales varía entre 0,5 y 5, aunque su valor normal está entre 2 y 3; valores inferiores a 2 se consideran bajos y superiores a 3 son altos. No tiene límite superior o en todo caso lo da la base del logaritmo que se utilice (Mora-Donjuán, Burbano-Vargas, Méndez-Osorio, & Castro-Rojas, 2017).

7.5. Evaluación del efecto del periodo de derrame de hidrocarburos sobre la cuantificación y cinética de crecimiento de comunidades bacterianas.

Una vez realizados todos los procedimientos anteriores se procederá a procesar los datos obtenidos mediante el paquete estadístico SPSS v.22. La comparación de las medias resultantes de la cuantificación de las UFC y cinética por cada pozo objeto de estudio, se compararán mediante el estadístico de ANOVA y la prueba de Tukey con grado de significación $p < 0.05$.

7. Referencias bibliográficas

- Martínez-Prado, A., Pérez-López, M. A., Pinto-Espinoza, J., Gurrola-Nevárez, B. A., & Osorio-Rodríguez, A. L. (2011). Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 27(3), 241-252.
- Suarez Beltrán, R. M. (2013). Guía de métodos de biorremediación para la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos.
- Pazmiño Valencia, Y. M. (2017). La proporcionalidad de las penas y la actividad petrolera en el Ecuador (Bachelor's thesis).
- Hidalgo, J. C. (2009). Efectos de los derrames de petróleo sobre los hábitats marinos. *Ciencia Ahora*, 24.
- Vázquez-Luna, M., Montiel-Flores, A., Vázquez-Luna, D., & Herrera-Tenorio, M. F. (2011). Impacto del petróleo crudo en suelo sobre la microbiota de vida libre fijadora de nitrógeno. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 13(3), 511-523.
- Barois, I., S.M. Contreras-Ramos, B. Hernández-Castellanos, M. de los Santos, F. Martínez y D. R. García. 2018. El suelo y el petróleo: Estudio de caso de biorremediación en pasivo ambiental de Papantla, México. Instituto de Ecología A.C. 30pp.
- Rodríguez-Gonzales, A., Zárate-Villarroe, S. G., & Bastida-Codina, A. (2022). Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar biorremediación. *Revista de Ciencias Ambientales*, 56(1), 178-208.
- Acuña, O., Peña, W., Serrano, E., Pocasangre, L., Rosales, F., Delgado, E., ... & Segura, A. (2006). La Importancia de Los Microorganismos en la Calidad y Salud de Suelos Importance of Microorganisms For Soils Quality And Health. *Laboratorio de Bioquímica, Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.*

Gregorio, M. J. METAGENÓMICA DE RNA RIBOSOMAL 16S (16S rRNA) COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA EN MICROBIOLOGÍA: MÉTODOS Y APLICACIONES BASADOS EN NEXT-GENERATION SEQUENCING (2019).

Cortés-López, N. G., Ordóñez-Baquera, P. L., & Domínguez-Viveros, J. (2020).

Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 11(4), 1150-1173.

Rojas, A. G. (1958). La Importancia del Petroleo Como Fuente de Energia. IN SPANISH.

The Importance of Oil As An Energy Source.

Romero, A., & Vera, M. (2018). Economía Política Del Petróleo (Political Economy of Oil). *Criterio Libre*, 16(28), 133-156.

Becerra, S., Paichard, E., & Maurice, L. (2013). Vivir con la contaminación petrolera en el Ecuador: percepciones sociales del riesgo sanitario y capacidad de respuesta. *Revista Lider*, 15(23), 102-120.

Petroecuador: 25 años con un deplorable récord ambiental. (2024, 13 julio). Juicio

Crudo.

de Almeida, F. F., Freitas, D., Motteran, F., Fernandes, B. S., & Gavazza, S. (2021).

Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated mangroves: Understanding the historical and key parameter profiles. *Marine Pollution Bulletin*, 169, 112553

Vogliano, S. (2009). Ecuador-Extracción petrolera en la Amazonía. *Conflictos socioecológicos. Combustibles fósiles*.

Kingston, P., Little, D., & Harkantra, S. (2000). Biological impacts of oil pollution: sedimentary shores, IPIECA Report Series. *IPIECA, London*. 21p.

Lidya, S. S. M. (2018). BACTERIAS DEL SUELO.