UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

ESCUELA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO AMBIENTAL

TÍTULO:

VARIACIÓN DE COMUNIDADES BACTERIANAS EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS EN LA PARROQUIA SAN CARLOS, JOYA DE LOS SACHAS, ORELLANA

AUTORA:

Hypatia Madeleine Ledesma Moncada

DIRECTORA:

Dra. Karina María Elena Carrera Sánchez

PASTAZA – ECUADOR

2020

DECLARATORIA DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Quien suscribe Hypatia Madeleine Ledesma Moncada con C.I. 2200146021, hace constar que es autora del Proyecto de Investigación/Trabajo de Integración Curricular titulado: Variación de comunidades bacterianas en suelos contaminados con hidrocarburos en la parroquia San Carlos, Joya de los Sachas, Orellana, el cual constituye una elaboración personal realizada únicamente con la dirección del Tutor de dicho trabajo, Dra. Karina María Elena Carrera Sánchez. En tal sentido, manifiesto la originalidad de la conceptualización del trabajo como interpretación de datos y elaboración de conclusiones dejando establecido que aquellos aportes intelectuales de otros autores se han referenciado debidamente en el texto de dicho trabajo.

En el cantón Pastaza, a los 31 días del mes de agosto del 2020.



Hypatia Madeleine Ledesma Moncada

Nombre del Estudiante

CI: 2200146021

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR EL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

El tribunal de sustentación del proyecto de investigación y desarrollo aprueba el proyecto de Investigación/Trabajo de Integración Curricular titulado: "Variación de comunidades bacterianas en suelos contaminados con hidrocarburos en la parroquia San Carlos, Joya de los Sachas, Orellana".



Msc. Angélica María Tasambay Salazar

Presidenta del Tribunal

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR EL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

El tribunal de sustentación del proyecto de investigación y desarrollo aprueba el proyecto de Investigación/Trabajo de Integración Curricular titulado: "Variación de comunidades bacterianas en suelos contaminados con hidrocarburos en la parroquia San Carlos, Joya de los Sachas, Orellana".



Msc. Danilo Pedro Sarabia Guevara

Miembro del Tribunal

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR EL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

El tribunal de sustentación del proyecto de investigación y desarrollo aprueba el proyecto de Investigación/Trabajo de Integración Curricular titulado: "Variación de comunidades bacterianas en suelos contaminados con hidrocarburos en la parroquia San Carlos, Joya de los Sachas, Orellana".



_____

Dr. Marcos David Landivar Valverde

Miembro del Tribunal

Oficio No. 210-SAU-UEA-2020

Puyo, 31 de agosto de 2020

Por medio del presente **CERTIFICO** que:

El Proyecto de Investigación correspondiente a la egresada LEDESMA MONCADA HYPATIA MADELEINE con C.I. 2200146021, con el Tema: **"VARIACIÓN DE COMUNIDADES BACTERIANAS EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS EN LA PARROQUIA SAN CARLOS, JOYA DE LOS SACHAS, ORELLANA"**, de la carrera, Ingeniería Ambiental. Directora del proyecto Dra.C. Cerezo Sánchez Carina María Elena, PhD. ha sido revisado mediante el sistema antiplagio URKUND, reportando una similitud del 2%, Informe generado con fecha 31 de agosto de 2020 por parte de la directora conforme archivo adjunto.

Particular que comunico a usted para los fines pertinentes

Atentamente,

Ing. Bolo Marcelo Lara Palco MSc.
ADMINISTRADOR DEL SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND – UEA -.

CERTIFICADO DE PORCENTAJE DE SIMILITUD OBTENIDO EN EL SISTEMA ANTI PLAGIO

Quien suscribe el presente Dra. Karina María Elena Carrera Sánchez con CI: 1600259285, certifica que el Proyecto de Investigación/Trabajo de Integración Curricular titulado: "Variación de comunidades bacterianas en suelos contaminados con hidrocarburos en la parroquia San Carlos, Joya de los Sachas, Orellana", ha sido examinado a través del sistema Antiplagio URKUND y presenta un porcentaje de similitud del 6 %.

En el cantón Pastaza, a los 31 días del mes de agosto del 2020.



_____

Dra. Karina María Elena Carrera Sánchez

Director del Proyecto de Investigación/Trabajo de Integración Curricular

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por bendecir cada actividad realizada durante este proceso, por proporcionarme sabiduría y las fuerzas necesarias para culminar esta investigación.

A los miembros de la Universidad Estatal Amazónica, directivos, docentes y personal de apoyo, que me brindaron la oportunidad de forjarme como profesional, a través de su enseñanza.

A la Dra. Karina Carrera, que gentilmente aceptó guiarme, dedicar parte de su tiempo e impartir sus conocimientos en la realización de este proyecto como tutora del mismo. De igual forma, al Dr. Roldan Torres por sus consejos, paciencia, sabiduría y deseos de colaboración hacía este estudio.

A mis padres quienes no dudaron en que sería capaz de cumplir cada una de mis metas y lograr ser una profesional ética, por su indudable apoyo y cariño durante todos estos años de estudio. A otros miembros de mi familia, que me impulsaban a no rendirme, a mis estimadas amigas y amigos que cuando decaía, me motivaban a continuar en conjunto.

Hypatia Madeleine Ledesma Moncada

DEDICATORIA

Dedico este proyecto investigativo a Dios por haber permitido este logro en mi vida, por su amor y cuidado. A mi madre Mary Moncada y mi padre Elder Ledesma sustento y motivación diaria de superación, por su apoyo incondicional a pesar de la distancia, por el sacrificio realizado con el fin de que concluyera mis estudios.

A toda mi familia por su cariño y preocupación constante hacia mi vida personal y estudiantil. A mis hermanos (as) en Cristo que me mantuvieron firme, sin desmayar, hasta lograr mi objetivo. A la Sra. Carmen Cajas y su familia por haberme recibido como un miembro más de ellos, por su preocupación constante y desinteresada.

A mis amigas (os) que fueron compañía y motivadoras constantes en mi desempeño académico y finalmente a mis compañeros por la experiencia compartida durante estos años.

Hypatia Madeleine Ledesma Moncada

RESUMEN

El suelo es un recurso vital, capaz de soportar el crecimiento vegetal, asentamientos poblacionales, actividades antrópicas y los residuos que generan, causando cambios y daños en la estructura del suelo. La elaboración de estudios ambientales sobre este recurso es de gran relevancia para su conservación. Es por ello el propósito de esta investigación fue determinar la variación numérica y diversidad de comunidades bacterianas de suelos contaminados con hidrocarburos desde hace 4 meses, 5 y 10 años, en la parroquia San Carlos, Joya de los Sachas, Orellana. A partir de la evaluación del efecto del periodo de derrame en la cuantificación y cinética de las comunidades bacterianas por medio de la preparación de diluciones e inoculación en cajas Petri. Para posteriormente realizar la cuantificación, caracterización morfo-cultural y diversidad de las colonias a través de los índices de Simpson y Shannon. Los resultados obtenidos, exponen la variación en la cuantificación y cinética debido a la influencia del periodo de derrame, el pozo tres (10 años) demuestra crecimiento exponencial y adaptación en sus colonias, con 1.3×10^{9} UFC. La caracterización morfo-cultural identificó la dominancia de la apariencia barbada, forma circular, elevación plana y borde ondulado. El índice de Simpson reflejó al pozo uno (4 meses) como el más diverso con 0.77, mientras que Shannon, define al pozo tres como el más diverso con 2.17.

Palabras Clave: cinética, diversidad, pozos, periodo

ABSTRACT

Soil is a vital resource, capable of supporting plant growth, population settlements, human activities and the waste they generate, causing changes and damage to the soil structure. The development of environmental studies on this resource is of great importance for its conservation. That is why the purpose of this research was to determine the numerical variation and diversity of bacterial communities of soils contaminated with hydrocarbons for 4 months, 5 and 10 years, in the parish of San Carlos, Joya de los Sachas, Orellana. Based on the evaluation of the effect of the spill period on the quantification and kinetics of bacterial communities through the preparation of dilutions and inoculation in petri boxes. To later carry out the quantification, morpho-cultural characterization and diversity of the colonies through the indices of Simpson and Shannon. The results obtained, expose the variation in quantification and kinetics due to the influence of the spill period, well three (10 years) demonstrates exponential growth and adaptation in their colonies, with 1.3 10 CFU. The morpho-cultutral characterization identified the dominance of the bearded appearance, circular shape, flat elevation and wavy edge. Simpson's index reflected well one (4 months) as the most diverse with 0.77, while Shannon defines well three as the most diverse with 2.17.

Keywords: kinetics, diversity, wells, period

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARATORIA DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS 2

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR EL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN 3

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR EL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN 4

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR EL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN 5

..... 6

CERTIFICADO DE PORCENTAJE DE SIMILITUD OBTENIDO EN EL SISTEMA ANTI PLAGIO 7

AGRADECIMIENTO 8

DEDICATORIA 9

RESUMEN 10

ABSTRACT 11

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN 16

1.1. Planteamiento del problema 16

1.2. Objetivos 16

Objetivo general 16

Objetivos específicos 16

1.3. Justificación 17

CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA 18

2.1. Extracción petrolera en la Amazonía Ecuatoriana 18

Industria hidrocarburífera en la provincia de Orellana 18

El sector petrolero en la Joya de los Sachas 18

2.2. Historia de la explotación petrolera en San Carlos 19

Incidencia de petroleras en la parroquia San Carlos 19

2.3. Suelo 20

Composición del suelo 21

Perfil del suelo 21

Afectaciones al suelo por derrames de hidrocarburos 22

2.4. Comunidades bacterianas en el suelo 22

Clasificación de las bacterias del suelo 23

Requerimientos de las bacterias para su crecimiento 24

Bacterias en suelos contaminados con hidrocarburos 24

Importancia de las bacterias para los suelos contaminados con hidrocarburos 25

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN 26

3.1. Localización 26

3.2. Tipo de investigación 27

3.3. Métodos de investigación 27

3.3.1. Muestreo del suelo 27

3.3.2. Evaluación del efecto del periodo de derrame de hidrocarburos sobre la cuantificación y cinética de crecimiento de comunidades bacterianas 28

3.3.3. Caracterización morfo-cultural de las comunidades bacterianas de suelos contaminados con hidrocarburos en diferentes periodos de derrames del contaminante 31

3.3.4. Determinación de la diversidad bacteriana en los suelos contaminados con hidrocarburos en los diferentes periodos de los derrames 32

CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS 34

4.1. Evaluación del efecto del periodo de derrame de hidrocarburos sobre la cuantificación y cinética de crecimiento de comunidades bacterianas 35

4.2. Caracterización morfo-cultural de las comunidades de bacterias de suelos contaminados con hidrocarburos en diferentes periodos de derrames del contaminante 40

4.3. Determinación de la diversidad de bacterias en los suelos contaminados con hidrocarburos en los diferentes periodos de los derrames 46

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 50

5.1. Conclusiones 50

5.2. Recomendaciones 51

BIBLIOGRAFÍA 52

ANEXOS 56

Índice de figuras

Figura 1**.** Bacterias del suelo por grupo funcional 23
Figura 2. Ubicación de la zona de estudio. Se observan tres diferentes puntos de muestreo, ubicados según el tiempo de ocurridos los derrames. P=Pozo 26
Figura 3. Muestreo aleatorio en cuadrante de cinco puntos 28
Figura 4. Procedimiento para la realización de las disoluciones y siembra en cajas Petri 29
Figura 5. Análisis microbiológicos de las comunidades bacterianas del suelo contaminado con hidrocarburos 30
Figura 6. Características morfológicas del crecimiento bacteriano 31
Figura 7. Cuantificación total de unidades formadoras de colonias (UFC) de 0-10 cm, en tres pozos con diferentes periodos de derrame. Letras desiguales en las columnas difieren para p<0.05 por HSD Tukey. Px-1, x=número de pozo, 1 profundidad 0-10 cm 35
Figura 8. Cuantificación total de unidades formadoras de colonias (UFC) de 10-30 cm, en tres pozos con diferentes periodos de derrame. Letras desiguales en las columnas difieren para p<0.05 por HSD Tukey. Px-2, x=número de pozo, 2 profundidad 10-30 cm 36
Figura 9. Cuantificación total de bacterias por pozos y profundidades en diferentes periodos de derrame (4 meses, 5 y 10 años). Letras desiguales en las columnas difieren para p<0.05 por HSD Tukey. La nomenclatura Px corresponde a P como pozo y x (número de pozo) 36
Figura 10. Comparación de UFC por influencia de tiempo de derrame entre pozos. Letras desiguales en las columnas difieren para p<0.05 por HSD Tukey. La nomenclatura Px corresponde a P como pozo y x (número de pozo) 37
Figura 11. Cuantificación de las comunidades bacterianas del Pozo 2 37
Figura 12. Cinética de crecimiento bacteriano en la profundidad 0-10 cm, en distintos tiempos para su proliferación (24, 48, 72 horas y 7 días), en tres pozos con diferente periodo de derrame. Letras desiguales en las columnas difieren para p<0.05 por HSD Tukey. La nomenclatura Px-1 corresponde a P como pozo, x (número de pozo) y 1 profundidad 0-10 cm 38
Figura 13. Cinética de crecimiento bacteriano por pozo en la profundidad 10-30 cm. Letras desiguales en las columnas difieren para p<0.05 por HSD Tukey. La nomenclatura Px-2 corresponde a P como pozo, x (número de pozo) y 2 profundidad 10-30 cm 39
Figura 14. Colonias bacterianas caracterizadas morfo-culturalmente 42
Figura 15. Elevación de tipo elevada y plana, predominante en P2 (0-10 cm) 43

Figura 16. Características morfológicas del crecimiento de las comunidades bacterianas de P3 0-10 cm 44
Figura 17. Diversidad de bacterias entre pozos en la profundidad 0-10 cm. El número uno, junto a la nomenclatura de los Px, x=número de pozo, representa la profundidad 0-10 cm ... 46
Figura 18. Diversidad de bacterias entre pozos en la profundidad 10-30 cm. El número dos, junto a la nomenclatura de los Px, x=número de pozo, representa la profundidad 10-30 cm . 47
Figura 19. Diversidad total de bacterias entre pozos determinada por el Índice de Simpson y Shannon 48

Índice de tablas

Tabla 1. Bloques petroleros existentes en la parroquia San Carlos 20
Tabla 2. Composición general del suelo 21
Tabla 3. Requerimientos bacterianos para su crecimiento 24
Tabla 4. Aspectos generales de la parroquia San Carlos 26
Tabla 5. Aislados bacterianos obtenidos de los tres pozos muestreados 34
Tabla 6. Caracterización morfo-cultural de las comunidades bacterianas del Pozo 1 con 4 meses de ocurrido el derrame, en la profundidad 0-10 cm 40
Tabla 7. Caracterización morfo-cultural de las comunidades bacterianas del Pozo 1 con 4 meses de ocurrido el derrame, en la profundidad 10-30 cm 41
Tabla 8. Caracterización morfo-cultural de las comunidades bacterianas del Pozo 2 con 5 años de ocurrido el derrame, en la profundidad 0-10 cm 42
Tabla 9. Caracterización morfo-cultural de las comunidades bacterianas del Pozo 2 con 5 años de ocurrido el derrame, en la profundidad 10-30 cm 44
Tabla 10. Caracterización morfo-cultural de las comunidades bacterianas del pozo tres (10 años) en la profundidad 0-10 cm 45
Tabla 11. Caracterización morfo-cultural de las comunidades bacterianas del pozo tres (10 años) en la profundidad 10-30 cm 45

Índice de ecuaciones

(1) Ecuación para calcular las Unidades formadoras de colonias (UFC) 29
(2) Fórmula para calcular Índice de Simpson 32
(3) Fórmula para calcular Índice de Shannon 32

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema

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 primer y segundo lugar, respectivamente). La parroquia San Carlos, delimitación geográfica donde se ubica este estudio, es parte del cantón Joya de los Sachas en la provincia de Orellana (Vogliano, 2009).

Las empresas petroleras, por la carga laboral, representan una de las principales fuentes de ingresos económicos para los pobladores, sin embargo, el desarrollo de sus actividades, en ocasiones generan derrames y desechos de hidrocarburos que afectan significativamente a grandes áreas de suelo productivo. Hasta el 2011 San Carlos fue víctima de sesenta y dos derrames de petróleo, contaminando el suelo, aire y agua de los sectores cercanos, según manifiestos de los habitantes y las evidencias encontradas (GADPO, 2011).

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 provincia de Orellana, así como en la parroquia San Carlos 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.

1.2. Objetivos

Objetivo general

Determinar la variación numérica y diversidad de comunidades bacterianas de suelos contaminados con hidrocarburos en diferentes periodos, en la parroquia San Carlos, Joya de los Sachas, Orellana.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del periodo de derrame de hidrocarburos sobre la cuantificación y cinética de crecimiento de comunidades bacterianas.

- Caracterizar morfo-culturalmente las comunidades de bacterias de suelos contaminados con hidrocarburos en diferentes periodos de derrames del contaminante.
- Determinar la diversidad de bacterias en los suelos contaminados con hidrocarburos en los diferentes periodos de los derrames.

1.3. Justificación

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.

En el suelo está la protección de la naturaleza y la arquitectura del paisaje, que en detalle son: producción de biomasa y alimentos, ciclado de nutrientes, regulación hídrica, interacciones ambientales, hábitat biológico, reserva genética, fuente de materias primas, patrimonio físico y cultural, y plataforma de estructuras antrópicas (González, Pulido, y Mora, 2018).

Las bacterias son partícipes en estas y otras funciones y constituyen el grupo más abundante de organismos unicelulares procariontes en la naturaleza. 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, convierten a estos microorganismos indispensables en este recurso (Lidya, 2018).

La Universidad Autónoma de Tamaulipas de México, a través de un estudio acerca de las variaciones de las poblaciones microbianas del suelo por la adición de hidrocarburos, genera una base científica en cuanto al tema de esta investigación, demostrando las alteraciones de las bacterias por la presencia de hidrocarburos, especialmente en las que tienen la capacidad de utilizarlos como fuente de carbono (Castro-Mancilla *et al*., 2013).

Es por esto que la presente investigación sobre el conocimiento de las variaciones numéricas, la diversidad y el efecto del periodo de derrame de hidrocarburos en las comunidades bacterianas, contribuiría a futuras investigaciones que beneficien a la parroquia San Carlos al ser una de las parroquias con mayor presencia de petroleras a una distancia de tres a cinco kilómetros cuadrados (Arteaga, 2003). Además, fortalecerá la vinculación de la teoría con la práctica y la solvencia profesional de la estudiante de Ingeniería Ambiental, autora de este estudio y alumna de la Universidad Estatal Amazónica.

CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1. Extracción petrolera en la Amazonía Ecuatoriana

La extracción y venta de petróleo se ha convertido en la base económica del país en el transcurso de la historia, esta actividad se ha realizado principalmente en la Amazonía Ecuatoriana, territorio que, en la actualidad, continúa con asentamientos de bases petroleras en algunas de las provincias que conforman esta región.

Vogliano (2009), menciona que la exploración petrolera en la Amazonia ecuatoriana se inicia en la década de los cincuenta. Al comenzar los procesos de exploración, se identifican yacimientos de crudo pesado en la zona centro sur amazónica y en la zona norte (Sucumbíos y Orellana) en donde se encuentra petróleo liviano, de muy buena calidad, y accesible en la medida de que la zona estaba habitada por las nacionalidades Siona, Cofán y Tetetes, que no eran tradicionalmente guerreras, por lo cual se facilita el ingreso de las misiones exploratorias y de la operación petrolera posteriormente.

Industria hidrocarburífera en la provincia de Orellana

Orellana es una de las provincias con mayor número de pozos, después de Sucumbíos como indica Arteaga (2003), Sucumbíos tiene un total de 438 (53%) y Orellana 363 (44%) pozos. Esta provincia basa su economía en el sector petrolero para muestra de ello, Herrera y Peña (2019), indican que, en 2015 en Ecuador se extrajeron 198 millones de barriles de petróleo, de éstos, 64 millones eran provenientes de bloques petroleros ubicados en la provincia de Orellana pero como toda actividad productiva, la extracción de petróleo origina desechos, derrames, vertidos, emisiones, entre otros, al medio en el que se realizan, por lo que, si bien se considera la segunda provincia pionera en aportar a la industria hidrocarburífera, también es una de las más contaminadas.

El sector petrolero en la Joya de los Sachas

Este cantón perteneciente a la provincia de Orellana se encuentra en el listado de cantones con mayor número de pozos por distancia entre ellos, así lo señala Arteaga (2003). Dentro del mismo, las parroquias con mayor presencia de petroleras a una distancia de tres a cinco kilómetros cuadrados son la parroquia Joya de los Sachas (parte urbana) y San Carlos (parte rural), por consecuencia según GADPO (2011), La Joya de los Sachas es el cantón más contaminado de la provincia con 159 derrames hasta el año 2011 es decir un 33, 06% con respecto a los otros cantones que conforman Orellana.

2.2. Historia de la explotación petrolera en San Carlos

Durante 1964 a 1990 la empresa petrolera Texaco desarrolló actividades de explotación de petróleo en la Amazonía Ecuatoriana, en lo que hoy en día son las provincias de Orellana y Sucumbíos, incluyendo varias de sus parroquias urbanas y rurales (Fernández, 2009). El mismo autor señala que uno de los grupos focales que sufrió impactos relevantes tras la serie de derrames provocados por Texaco fue la parroquia San Carlos perteneciente al cantón Joya de los Sachas.

Hace aproximadamente 70 años San Carlos inició su producción petrolera, llegando a alcanzar en la actualidad un total de 76 pozos de las operadoras ENAP, SIPEC y EP-PETROECUADOR abarcando 79,113.7 hectáreas ocupando mayoritariamente el área total de la parroquia San Carlos (GADPO, 2011).

Saúl Gallardo, Teniente Político del cantón Orellana (en ese entonces) mencionó en una carta el 2 de agosto de 1973:

> De los pozos petroleros localizados en los sectores de San Carlos se está echando petróleo o desperdicios de este mismo, a las quebradas cercanas, siendo pues arrastradas hasta la orilla del río Napo produciéndose la correspondiente contaminación de las aguas, razón por la cual se viene encontrando cantidades de peces muertos a más de que el líquido se hace inservible (Fernández, 2009).

Luego de 56 años de ocurridos estos derrames se aprecian las consecuencias del impacto ambiental, tales como, la pérdida de fertilidad y reproducción de las especies que se encuentran en el suelo o el agua como lo manifiesta Kingston *et al*. (2000), el petróleo en ecosistemas tropicales impacta gravemente a las especies que habitan entre estas zonas contaminadas. Sin embargo, Pacheco y Carriel (2020), mencionan la posibilidad de adaptaciones en las comunidades bacterianas, que usen como fuente de consumo los hidrocarburos. Así mismo, Cabrera (2017), sostiene la capacidad de las adaptaciones fisiológicas de especies en el ecosistema.

Incidencia de petroleras en la parroquia San Carlos

Se han perforado aproximadamente 76 pozos en esta parroquia desde el inicio de su explotación petrolera hasta el año 2011, de los que el 93.37 % están en producción y el porcentaje restante corresponden a pozos inyectores, así como también se registran 85 piscinas y pasivos ambientales, datos pertenecientes a petroleras de servicio público, en éstos no se

encuentran añadidos los datos de instituciones privadas que realizan esta actividad (GADPRSC, 2015).

San Carlos con 62 derrames, representa el 12.89 % respecto a los registrados dentro de la provincia de Orellana, éstos fueron contabilizados hasta el año 2011, según GADPO (2011), considerando a su vez que dentro de esta parroquia se encuentra la Estación Científica San Carlos denominada como Bosque Protector por el MAE, misma que se ha visto afectada por los pasivos ambientales generados por la industria petrolera en la zona, solo en esta área se evidencian cinco derrames, siete piscinas y dos pozos.

Esta parroquia denota alta contaminación, la presencia de bases petroleras es visible de inicio a fin, la población de San Carlos se ha visto perjudicada directamente en el transcurso de los años debido a esta actividad. San Carlos alberga tres bloques.

Tabla 1
Bloques petroleros existentes en la parroquia San Carlos

Nombre	Operadora	Área (Hectáreas)
MPC	ENAP SIPEC	6,128.01
PBH	ENAP SIPEC	39,064.01
SACHA	EP-PETROECUADOR	33,921.68

Adaptado de: (GADPO, 2011)

2.3. Suelo

La definición de este recurso ha ido evolucionando, principalmente se consideraba al suelo únicamente como un medio natural en el que crecen las plantas, este contexto varió con el tiempo, se denominó en su momento como la colección de cuerpos naturales sobre la superficie de la tierra que contienen materia viviente y soportando o capaces de soportar plantas en crecimiento. Como todo cuerpo, tiene forma y límites (Fadda, 2003).

Fadda (2017), define, "*El suelo es un medio o la formación natural resultante de la transformación de la roca madre subyacente bajo la influencia de diversos procesos físicos, químicos y biológicos que cuando contiene cantidades apropiadas de agua, aire y nutrientes, ofrece soporte mecánico y sustento a las plantas*". Este enunciado es el resultado de la unión de dos corrientes que especifican a este recurso, la primera la expuesta por Ramman en 1928 y la segunda de Hilgard en 1924.

Composición del suelo

El suelo posee componentes sólidos, líquidos y gaseosos, que contienen un número casi ilimitado de elementos constituyentes, así los cristales de los minerales de arcilla, que suelen estar formados por partículas dispuestas en varias capas unitarias. Se debe entender por partículas no solo a las que forman los separados mecánicos, como arena, lima y arcilla, sino también los agregados estructurales que se han formado por agregación de fracciones de mecánicas más pequeñas (Gamboa Mariñas, 2019).

Para determinar estos tipos de separados mecánicos, en la composición general del suelo se establecen diferentes factores que se definen en la siguiente tabla.

Tabla 2
Composición general del suelo

Factores	Definición
Fracción mineral	Fragmentos minerales del suelo (pedruscos, guijarros, grava, arena, limo, arcilla, etc.)
Propiedades del suelo según su composición	Permeabilidad, almacenamiento de agua, aireación, nutrientes.
Fracción orgánica	Humus. Formado principalmente por restos de organismos muertos, excreciones, etc., que no pueden volver a su estructura original.
Factores físicos	Densidad, textura, estructura, color
Factores químicos	Capacidad de intercambio catiónico, pH.
Factores biológicos	Mineralización, des-nitrificación, fijación biológica, etc.

Adaptado de: (Ibañez y Fontúrbel, 2004)

Perfil del suelo

La transformación de un "no suelo" se produce como consecuencia de un conjunto de reacciones y redistribuciones de la materia (orgánica y mineral) que a partir del material originario dan lugar a una horizontalización del material hasta constituir el denominado perfil. Son las responsables de la formación de los distintos horizontes y reciben el nombre genérico de procesos formadores del suelo (Ibañez Asensio y Moreno Ramón, 2019).

El perfil del suelo está compuesto por varias capas u horizontes. Dokuchaev realizó la primera clasificación de los horizontes. Dividiéndolos en:

- Horizonte A: Acumulación de sustancias orgánicas o húmico.
- Horizonte B: Intermedio entre el horizonte húmico y la roca madre.
- Horizonte C: Roca madre poco variable.
- Horizonte R: Roca originaria (dura o friable) (Hernández *et al.*, 2008).

Afectaciones al suelo por derrames de hidrocarburos

Los vertidos de petróleo en el suelo provocan cambios en la estructura y en los procesos físicos, químicos y biológicos que tienen lugar en este recurso. Zamora, Ramos, y Arias (2012), mencionan que el derrame de hidrocarburos de petróleo al suelo tiene impactos importantes en la actividad de los microorganismos alterando los procesos bio-geoquímicos, y afecta la funcionalidad del ecosistema, originan efectos directos sobre la biota, dañando a plantas, animales y seres humanos.

Así mismo Guevara *et al.* (2006), afirman que los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos, como evaporación y penetración, que, dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida pueden ser procesos más o menos lentos lo que ocasiona una mayor toxicidad.

2.4. Comunidades bacterianas en el suelo

Las bacterias son microorganismos unicelulares de tipo procariótico, es decir, son organismos que solo se pueden observar al microscopio, constituidos por una sola célula autónoma que además no tiene membrana nuclear (Alvarez, 2011).

Pueden ser:

- Alargadas (bacilos)
- Esféricas (Cocos)
- Espirales (espirilos)

El suelo alberga por unidad de volumen la mayor biodiversidad y número de microorganismos. Se ha calculado que tan sólo un gramo de suelo fértil puede contener hasta 1×10^{10} células procariotas y varios miles de especies diferentes. En particular, se estima que en el caso de los procariotas pueden encontrarse entre 2,000 y 18,000 genomas bacterianos

diferentes por gramo de suelo (Ortíz-Maya, Escalante-Espinosa, Fócil-Monterrubio, Ramírez-Saad, y Díaz Ramírez, 2017).

Según Casanova (2005), las bacterias del suelo son microorganismos unicelulares y representan una de las formas de vida más simples y más pequeñas que se conoces. Éstas existen en el suelo en colonias o grupos, alrededor de partículas de suelo, son capaces de producir esporas y otras formas resistentes para condiciones no favorables. Las bacterias dominan en sus funciones e importancia en el suelo a los hongos, algas y actinomicetos, las funciones únicas que llevan a cabo son:

- Oxidación del nitrógeno
- Oxidación del azufre orgánico
- Fijación simbiótica y no simbiótica del nitrógeno en las plantas.

Clasificación de las bacterias del suelo

Benintende (2000), clasifica a las bacterias del suelo en dos grandes grupos:

- **Especies nativas o autóctonas:** están presentes en el suelo y su número se mantiene aproximadamente constante, con excepción de aquellas nativas denominadas "zimógenas" por Winogradsky, que profileran ante el agregado de un sustrato específico.
- **Especies alóctonas:** no participan activamente en las funciones bioquímicas de la comunidad. Llegan al suelo con las precipitaciones, en tejidos enfermos, aguas negras.

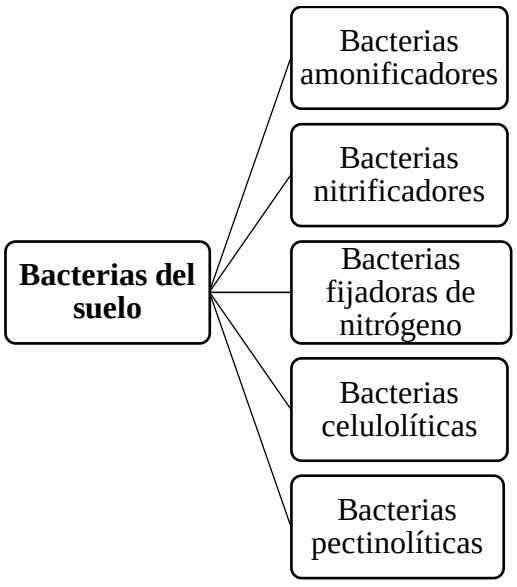


Figura 1. Bacterias del suelo por grupo funcional
Fuente: Elaboración propia

Requerimientos de las bacterias para su crecimiento

Los microorganismos como todo ser vivo necesitan algunas condiciones para su óptimo crecimiento.

> Se considera crecimiento bacteriano al aumento ordenado de todos los componentes celulares, o sea que el resultado final es la duplicación celular. Éste se inicia con la captación de nutrientes a partir del medio ambiente y los pasos intermedios entre la captación de nutrientes y la división celular constituyen el metabolismo bacteriano. El metabolismo bacteriano está compuesto de dos etapas: una de síntesis o anabolismo y una de destrucción o catabolismo (…) (Merino, 2009).

Además, las bacterias captan nutrientes del medio en el que se encuentran, de esto dependerá también la capacidad de adaptación. Estos son algunos de sus requerimientos:

Tabla 3
Requerimientos bacterianos para su crecimiento

Requerimientos	Detalle
Oxígeno	Reflejan el tipo de metabolismo. Según su relación con el oxígeno pueden ser: anaerobias, aerobias y micro-aerófilas.
Anhídrido carbónico	Es requerido por todas las bacterias, algunas en menor o mayor porcentaje.
Temperatura	Influye en la proliferación y mantenimiento de la vitalidad de los microorganismos.
pH	Generalmente cada microorganismo tiene un rango de pH en el que puede crecer.
Agua	Requerimiento esencial para todo ser vivo y la disponibilidad de ésta es un factor importante que afecta el crecimiento de los microorganismos
Nutrientes	Macro-nutrientes, micro-nutrientes, vitaminas, elementos traza.

Adaptado de: (Varela y Grotiuz, 2008)

Bacterias en suelos contaminados con hidrocarburos

Las poblaciones microbianas son alteradas por la presencia de hidrocarburos, particularmente las que tienen la capacidad de utilizarlos como fuente de carbono. La actividad

de los microorganismos presentes en un suelo contaminado con petróleo se puede favorecer al mejorar las condiciones edáficas, con adición de nutrimentos, agua y aplicando aireación, lo cual facilita la mineralización del butano. Las bacterias hidrocarbonoclastas crecen a expensas del contaminante antes mencionado, si se dispone de las proporciones adecuadas de carbono, hidrogeno, nitrógeno y fósforo (C, H, N y P) entre otros elementos (Castro-Mancilla *et al*., 2013).

Los siguientes géneros de bacterias, representan a las que generalmente se adaptan y crecen en suelos contaminados con hidrocarburos como indican (Silva *et al.*, 2008):

- *Achromobacter, Acidovorax, Acinetobacter, Aeromonas, Agrobacterium, Alcaligenes, Arthrobacter.*
- *Bacillus, Beijerinckia, Burkholderia*.
- *Comamonas, Corynebacterium.*
- *Flavobacterium.*
- *Microbacterium, Micrococcus, Moraxella, Mycobacterium.*
- *Neptunomonas, Nocardia.*
- *Paenibacillus, Porphyrobacter, Pseudomonas.*
- *Ralstonia, Rhodococcus.*
- *Sphingomonas, Streptomyces.*
- *Vibrio y Xanthomonas.*

Importancia de las bacterias para los suelos contaminados con hidrocarburos

Según Ortiz *et al.* (2005), la importancia de las bacterias radica en que tienen la capacidad de crecer a partir de la utilización de sustancias recalcitrantes al medio ambiente. Algunos de ellos son capaces de degradar estos compuestos hasta dióxido de carbono, sales, agua y otros productos inocuos al medio ambiente los cuales se integran posteriormente a los ciclos biogeoquímicos naturales.

Por otra parte Hernández-Acosta (2006), menciona que la importancia de estas bacterias en suelos contaminados está en que pueden proporcionar N a las plantas, situación que las favorece a crecer en estos sitios, en los cuales, por lo general, existen deficiencias de nitrógeno.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización

Los diferentes puntos o áreas de estudio se encuentran en la parroquia San Carlos, cantón Joya de los Sachas, provincia de Orellana, 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 13,437.41 km^2.

Tabla 4.
Aspectos generales de la parroquia San Carlos

Aspectos	Datos
Altitud	270 msnm
Clima	Húmedo-tropical
Temperatura	28 °C
Precipitación	2650 a 4500 mm anuales
Suelos	Arcillosos
Topografía	Llanura
Hidrografía	Cuenca del río Huamayacu y Yanayacu

Tomado de: (GADPRSC, 2015)

Para la delimitación de las tres zonas de estudio, se utilizó herramientas como Google Earth, ArcGis 10.5 y bases de georreferenciación de ArcGlobe.



Figura 2. Ubicación de la zona de estudio. Se observan tres diferentes puntos de muestreo, ubicados según el tiempo de ocurridos los derrames. P=Pozo
Fuente: Elaboración propia

3.2. Tipo de investigación

Esta investigación está enmarcada dentro de la Gestión y Conservación Ambiental, siendo ésta una de las líneas de investigación de la Universidad. El tipo de investigación al que pertenece es la experimental, sin embargo, dadas las circunstancias nacionales e internacionales por la pandemia de COVID-19, al haber realizado la prácticas experimentales con anterioridad, específicamente desde el 17 al 27 de febrero del 2020, antes de la declaración de emergencia nacional, esta investigación se realizó basándose en los resultados obtenidos en el laboratorio de la UEA (caracterización morfo-cultural de las comunidades de bacterias), convirtiéndose en una investigación descriptiva-comparativa ya que permitió la comparación de las variables durante el análisis de resultados, facilitando la determinación de la variación numérica y diversidad de comunidades bacterianas de suelos contaminados con hidrocarburos en diferentes periodos de ocurridos los derrames.

3.3. Métodos de investigación

La siguiente investigación se basó en el método analítico, mismo que permite verificar o validar una hipótesis experimental a través de la estadística, observación directa o actividades experimentales. Este método analiza el fenómeno que estudia, lo descompone en sus elementos básicos (Raffino, 2019). Por lo que, para determinar la variación numérica y diversidad de comunidades bacterianas se realizó un muestreo estratificado en tres zonas distintas aledañas a pozos petroleros de la parroquia San Carlos, en las que hubo derrames en diferentes periodos específicamente en 4 meses, 5 y 10 años, puntos escogidos por su accesibilidad y rango de tiempo. Las muestras se trasladaron al laboratorio de microbiología de la Universidad Estatal Amazónica para los correspondientes análisis microbiológicos. Se evaluó el efecto del periodo de derrame de hidrocarburos sobre la cuantificación y cinética de crecimiento de comunidades bacterianas, así como la diversidad de las bacterias de los suelos contaminados con hidrocarburos mediante el cálculo de los índices de diversidad Simpson y Shannon.

3.3.1. Muestreo del suelo

La toma de muestras se realizó mediante la metodología propuesta por (Mendoza y Espinoza, 2017). Esta consistió en el muestreo en tres zonas cercanas a pozos o bloques de extracción de petróleo ubicadas en la parroquia San Carlos, cantón Joya de los Sachas provincia de Orellana, mismas que tras varios derrames de petróleo recibieron altas cantidades del contaminante. Los puntos en los que se muestreó fueron elegidos según el lapso de tiempo en el que hayan ocurrido los derrames. Para esta investigación se definió en 4 meses, 5 años y 10

años respectivamente, para ello se procedió a tomar 3 muestras de suelo a las profundidades de 0-10 cm y 10-30 cm, en un cuadrante con 5 puntos distintos, convirtiéndose en sub-muestras para conformar por cada pozo y profundidad una muestra compuesta Fig. 3. Las muestras se conservaron en bolsas herméticas (ziploc) en refrigeración y se trasladaron al laboratorio de microbiología de la Universidad Estatal Amazónica.

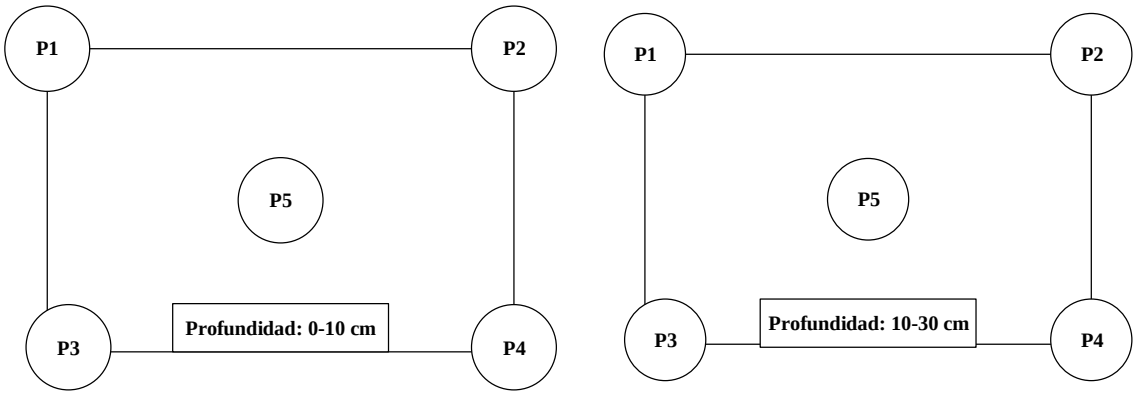


Figura 3. Muestreo aleatorio en cuadrante de cinco puntos
Fuente: Elaboración propia

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

3.3.2.1. Preparación de diluciones (Número Más Probable NMP)

Se utilizó la metodología propuesta por Chandrapati & Williams (2014), con la finalidad de cuantificar las UFC bacterianas existentes en las muestras recolectadas. Esta metodología consiste en la realización de diluciones cuantitativas seriadas, por ello se procedió a realizar diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-7} en tubos de ensayo de 40 mL (42 tubos de ensayo), los que contenían 9 mL de agua peptonada. En el primer tubo de ensayo de cada serie se añadió 1 gramo de cada muestra, para posteriormente añadir 1 mL de ésta al siguiente tubo respectivamente Fig. 4. Este proceso se realizó en condiciones estériles en la cámara de flujo laminar.

3.3.2.2. Procedimiento para siembra en cajas Petri y cuantificación de colonias bacterianas

Una vez realizadas las diluciones en serie en los tubos de ensayo, se realizó 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, & Jamwal, 2017) y (Torres, 2008).

Para la inoculación en cajas Petri se utilizó el medio de cultivo Agar Nutriente siendo éste un medio general propicio para el crecimiento, aislamiento y recuento de bacterias. Se calculó la cantidad de medio a utilizar según el número de cajas Petri y muestras por cada repetición

(R I-R III), en este caso el Agar Nutriente se preparó a razón de 28 gramos por 1000 mL, según lo establecido por el fabricante.

Al tener preparadas las diluciones y el medio de cultivo, se realizó la inoculación usando micro-pipetas para facilitar la absorción de 1 mL de cada dilución y el depósito en las cajas Petri. Seguidamente se colocó el medio de cultivo preparado, aproximadamente 20 mL por cada caja Fig. 4. Para finalizar el proceso se cubrió la caja Petri con la tapa y se efectuaron movimientos en cuatro cuadrantes que permitieron lograr un crecimiento homogéneo y puntiforme de las comunidades bacterianas.

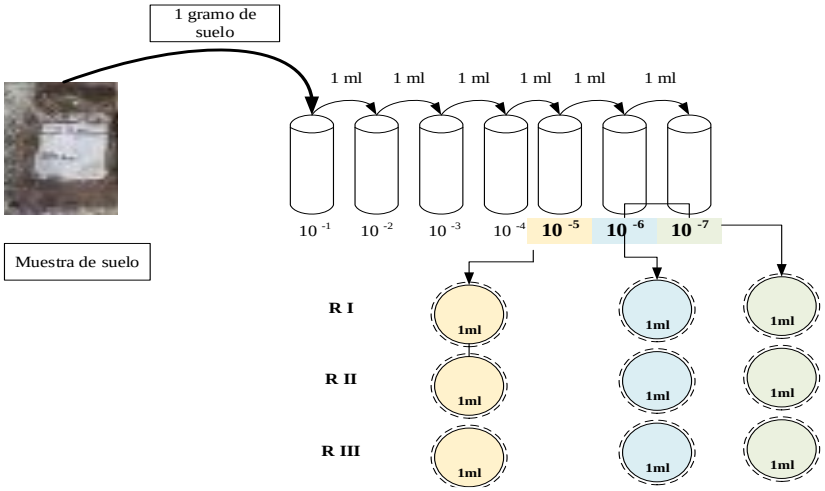


Figura 4. Procedimiento para la realización de las disoluciones y siembra en cajas Petri
Adaptado de: (Torres, 2008)

Las cajas Petri se incubaron a 30 °C y las colonias se cuantificaron en 24, 48 y 72 horas, después de este último conteo el siguiente se realizó a los 7 días de su siembra según el método de UFC propuesto por (Arana, 2015). Para calcular el UFC se aplicó la siguiente fórmula:

(1)

$$UFC = \frac{(\frac{\sum N°pm}{N°C})}{V} * FD$$

Donde:

UFC: Unidades Formadoras de colonias

∑N°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



Figura 5. Análisis microbiológicos de las comunidades bacterianas del suelo contaminado con hidrocarburos
Fuente: Elaboración propia

Una vez realizados los procedimientos anteriores se procesaron los datos obtenidos mediante el paquete estadístico SPSS v.22, mediante el estadístico ANOVA y la prueba de Tukey con grado de significación $p<0.05$.

3.3.3. 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 se llevó a cabo en base a la observación de la apariencia del crecimiento microbiano, forma de la colonia, elevación de la colonia y bordes de la colonia Fig. 5 (Guamán, Torres, y Nápoles, 2016) .

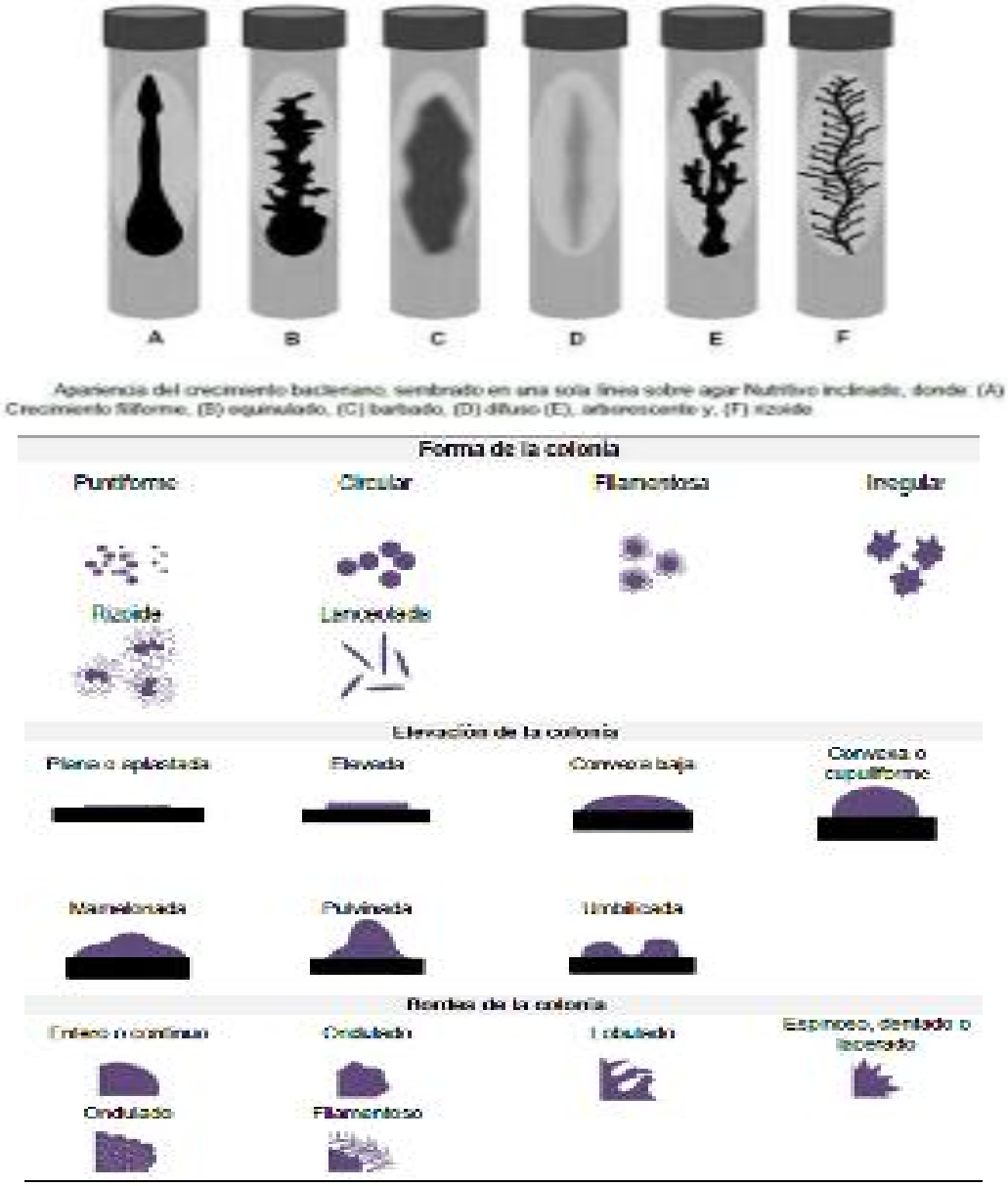


Figura 6. Características morfológicas del crecimiento bacteriano

Tomado de: (Rodríguez, 2016)

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

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

La diversidad bacteriana se determinó 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) los clasificó en:

- Índices de equidad: aquellos que toman en cuenta el valor de importancia de cada especie.
- Índices de heterogeneidad: los que además del valor de importancia consideran también el número total de especies en la comunidad.

Sin embargo, cualquiera de éstos, 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 y 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):

(2)

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

Dónde:

λ**:** Índice de Simpson

$\sum \boldsymbol{pi}$**:** 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 pi , tiende a cero en comunidades poco diversas (Soler, Berroterán, Gil, y 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):

(3)

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

Dónde:

$\boldsymbol{H'}$**:** Índice de Shannon-Wiener

$\sum \boldsymbol{pi}$**:** Sumatoria de la abundancia proporcional de la especie (i)

Ln: Logaritmo natural

El valor de H' varía de 0 y $\ln(pi)$, tiende a cero en comunidades poco diversas (Ferriol Molina y 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, y Castro-Rojas, 2017).

CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se obtuvieron 23 aislados bacterianos en los tres pozos, divididos según su profundidad. Se escogieron a las comunidades bacterianas con características distintivas. De cada uno de los pozos se seleccionaron al menos dos aislados, a excepción de la profundidad 0-10 cm en el Pozo 3, en el cual no se seleccionaron aislados, ya que las comunidades bacterianas presentaban características similares a las previamente escogidas. La profundidad y pozo con mayor número de aislados (12) fue la de 10-30 cm en el Pozo 3 (Tabla 5).

Tabla 5.

Aislados bacterianos obtenidos de los tres pozos muestreados

Pozo	Profundidad	Código del aislado
Pozo 1	0-10 cm	UEA-P1-1.A1
		UEA-P1-1.A2
	10-30 cm	UEA-P1-2.A1
		UEA-P1-2.A2
		UEA-P1-2.A3
Pozo 2	0-10 cm	UEA-P2-1.A1
		UEA-P2-1.A2
		UEA-P2-1.A3
	10-30 cm	UEA-P2-2.A1
		UEA-P2-2.A2
		UEA-P2-2.A3
Pozo 3	0-10 cm	-
	10-30 cm	UEA-P3-2.A1
		UEA-P3-2.A2
		UEA-P3-2.A3
		UEA-P3-2.A4
		UEA-P3-2.A5
		UEA-P3-2.A6
		UEA-P3-2.A7
		UEA-P3-2.A8
		UEA-P3-2.A9
		UEA-P3-2.A10
		UEA-P3-2.A11
		UEA-P3-2.A12

Nota. La nomenclatura Px-1 o Px-2, significa, x=número de pozo, 1 profundidad 0-10 cm, 2 profundidad 10-30 cm. A=Aislado.
Fuente: Elaboración propia

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

Es de relevancia la representación de la población bacteriana en el Pozo 3 en la profundidad 0-10 cm que después de 10 años de ocurrido el derrame posee 1.3×10^9 UFC, por encima de los dos pozos restantes. Lo que claramente indica que la adaptabilidad bacteriana en suelos contaminados con hidrocarburos, aumenta proporcionalmente con el tiempo. Aunque haya mayor cantidad de UFC en P3-1, no se desestima, la importancia que refleja la gran cantidad bacteriana existente tanto en el Pozo 1 (4 meses) como en el 2 (5 años). P1-1 difiere estadísticamente (p<0.05) de P3-1 y viceversa por lo expuesto anteriormente referente a los datos de las unidades formadoras de colonias Fig. 7

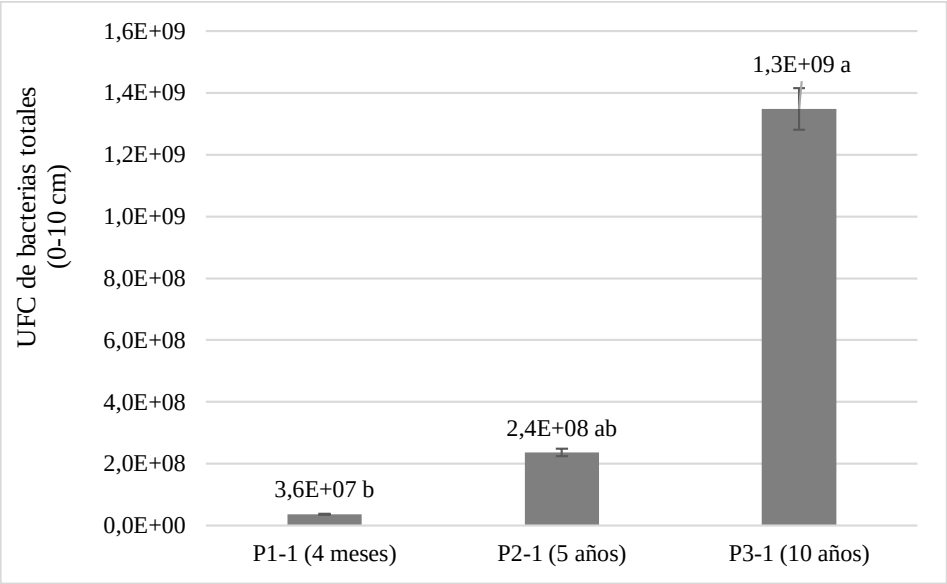


Figura 7. Cuantificación total de unidades formadoras de colonias (UFC) de 0-10 cm, en tres pozos con diferentes periodos de derrame. Letras desiguales en las columnas difieren para p<0.05 por HSD Tukey. Px-1, x=número de pozo, 1 profundidad 0-10 cm
Fuente: Elaboración propia

Los resultados obtenidos en la cuantificación bacteriana en la profundidad 10-30 cm Fig.8, exponen, una vez más, la notable influencia del tiempo de derrame en el crecimiento bacteriano ya que, el análisis realizado expone al Pozo 3 como el de mayor cantidad de comunidades bacterianas con 1.2×10^9 UFC, así mismo difiere estadísticamente (p<0.05) del Pozo 1 con 4 meses de ocurrido el derrame, que posee 2.4×10^8 UFC.

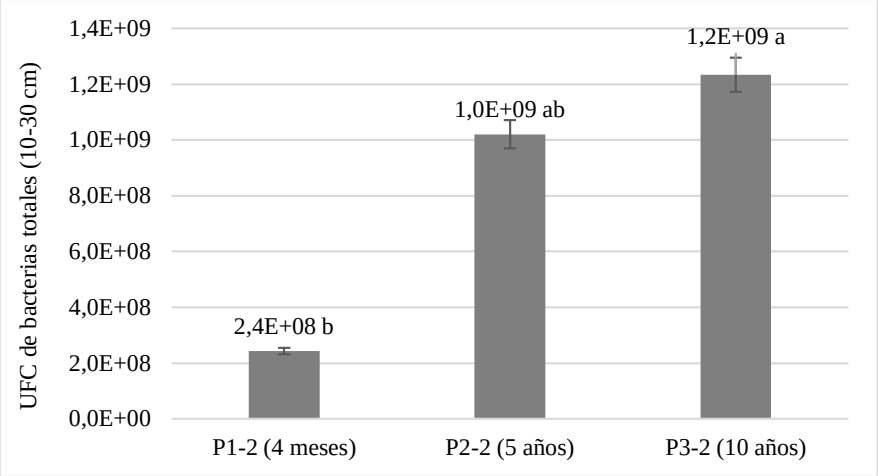


Figura 8. Cuantificación total de unidades formadoras de colonias (UFC) de 10-30 cm, en tres pozos con diferentes periodos de derrame. Letras desiguales en las columnas difieren para $p<0.05$ por HSD Tukey. Px-2, x=número de pozo, 2 profundidad 10-30 cm
Fuente: Elaboración propia

El Pozo 1 en ambas profundidades al tener 4 meses de ocurrido el derrame, desarrolló menor UFC con respecto a los dos pozos restantes, mientras que después de 10 años de sucedido el derrame en el Pozo 3 las comunidades bacterianas crecieron abundantemente, destacando de entre las dos profundidades, la de 0-10 cm, en la que hubo mayor proliferación bacteriana, 1.3×10^{9} UFC. P1-1, P1-2, P2-1 tuvieron diferencias estadísticas ($p<0.05$) de P3-1 Fig.9.

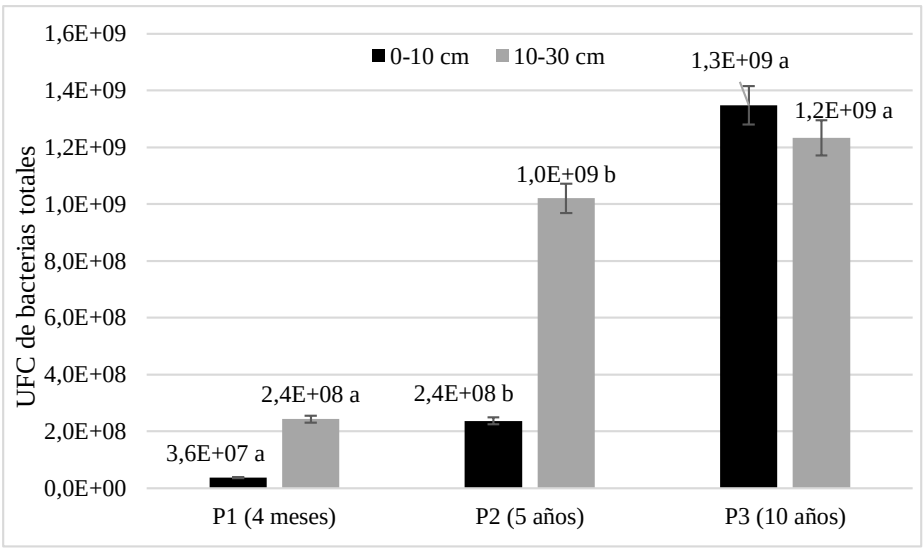


Figura 9. Cuantificación total de bacterias por pozos y profundidades en diferentes periodos de derrame (4 meses, 5 y 10 años). Letras desiguales en las columnas difieren para $p<0.05$ por HSD Tukey. La nomenclatura Px corresponde a P como pozo y x (número de pozo)
Fuente: Elaboración propia

El Pozo 3 es el que tiene mayor tiempo con presencia de hidrocarburos en el suelo, ya que su derrame aconteció hace 10 años, por lo que se asocia la posibilidad de que este lapso de tiempo contribuya en el crecimiento abundante y adaptabilidad en el medio de las comunidades

bacterianas, tal como muestra la Fig. 10. La presencia de 1.3×10^{9} UFC en el pozo tres, comprueba los argumentos expuestos en análisis anteriores, acerca de la significativa diferencia en la cantidad de población bacteriana sobre los Pozos 1 y 2. Carmen Rivera, Ferrera, Volke, Luis, y Rodríguez (2002), mencionaron que el aumento significativo de las poblaciones microbianas probablemente está relacionado con el tiempo de exposición y de adaptación de las bacterias y hongos a los HAP presentes en el suelo contaminado.

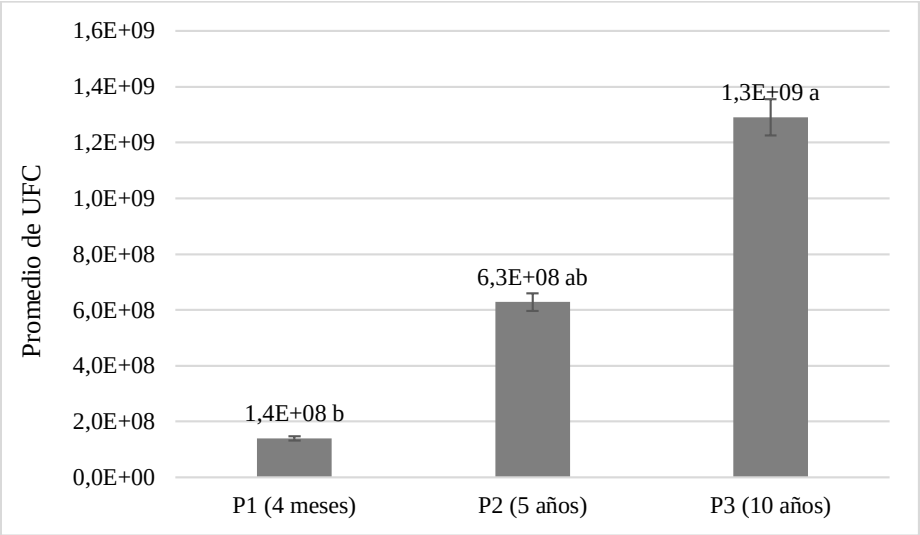


Figura 10. Comparación de UFC por influencia de tiempo de derrame entre pozos. Letras desiguales en las columnas difieren para $p<0.05$ por HSD Tukey. La nomenclatura Px corresponde a P como pozo y x (número de pozo)
Fuente: Elaboración propia

Existe una diferencia aproximada de 4.9×10^{8} UFC entre el Pozo 1 con un periodo de derrame de 4 meses y el Pozo 2 de 5 años. Así mismo el Pozo 1 difirió estadísticamente ($p<0.05$) del Pozo 3. Recordando el análisis de la diversidad bacteriana, es posible comparar la dominancia del pozo tres en cantidad de UFC y su diversidad por medio del índice de Shannon, con la diversidad del pozo uno según el índice de Simpson.



Figura 11. Cuantificación de las comunidades bacterianas del Pozo 2
Fuente: Elaboración propia

La cinética de crecimiento bacteriano en la profundidad 0-10 cm en todos los pozos estuvo en la fase exponencial en 24 h (1 día) de haberse realizado la inoculación, demostrando que las bacterias son de crecimiento rápido y por consiguiente bien adaptadas a las condiciones ambientales Fig. 12. Durante el intervalo de 24 a 48 horas se evidenció como el crecimiento fue disminuyendo, entrando en fase estacionaria, Pedrique (2008), mencionó que esto ocurre debido a las limitaciones del crecimiento, ya sea por agotamiento de algún nutriente esencial, por acumulación de productos tóxicos, porque se alcance un número de células elevado para el espacio disponible o por una combinación de las causas anteriores. Posterior a esto, en las 72 h (3 días) y 7 días el crecimiento bacteriano se mantuvo en fase estacionaria.

Se observa claramente que el Pozo 3 crece exponencialmente en grandes cantidades de UFC, teniendo semejanza con la cuantificación bacteriana analizada en la Fig. 7. Por lo que la influencia del periodo de derrame de este pozo (10 años) en la cuantificación y cinética de crecimiento es evidente, ya que al haber estado más tiempo en contacto con el contaminante las bacterias desarrollaron la capacidad de adaptarse mucho más rápido en diferentes medios, en comparación a las comunidades bacterianas que proliferaron en el Pozo 1 y 2. El Pozo 1 presentó una diferencia estadística (p<0.05) en 48 horas con el Pozo 3, en el resto de variables no hubo disimilitudes significativas.

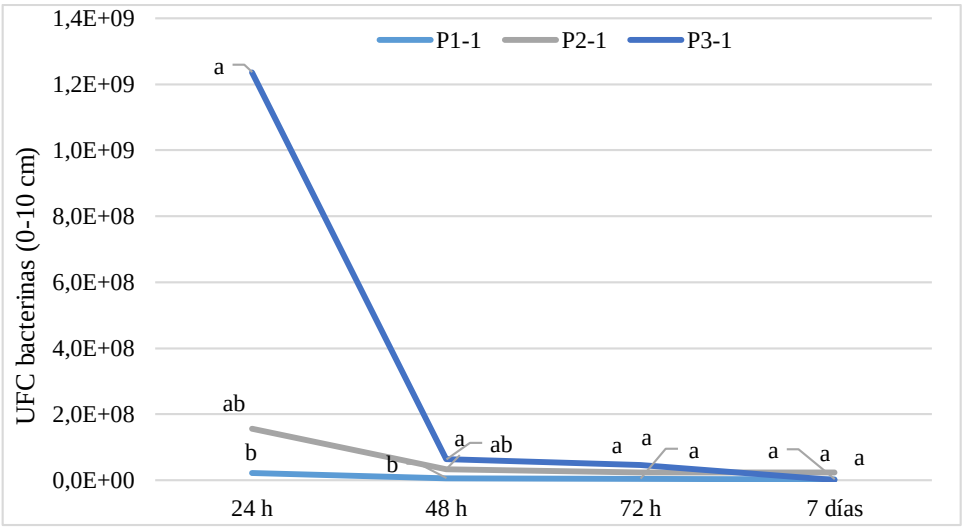


Figura 12. Cinética de crecimiento bacteriano en la profundidad 0-10 cm, en distintos tiempos para su proliferación (24, 48, 72 horas y 7 días), en tres pozos con diferente periodo de derrame. Letras desiguales en las columnas difieren para p<0.05 por HSD Tukey. La nomenclatura Px-1 corresponde a P como pozo, x (número de pozo) y 1 profundidad 0-10 cm
Fuente: Elaboración propia

Los pozos en la profundidad de 10-30 cm, obtuvieron resultados similares en la cinética de crecimiento de la profundidad de 0-10 cm. De la misma manera hubo un crecimiento

exponencial en las comunidades bacterianas durante las primeras 24 horas (1 día) de haber realizado la siembra, lo que provoca que con la misma rapidez en que se adaptaron, disminuya su crecimiento. Causando que en 48 horas (2 días) tanto el pozo uno y dos, comiencen la fase estacionaria, sin embargo, el pozo tres aún demuestra un ligero crecimiento, mayor al de los dos pozos antes mencionados.

En 72 horas (3 días) y en los días posteriores (7 días) el Pozo 1 y 2 continúan en fase estacionaria al igual que el Pozo 3. Narváez y L. Gómez (2008), en su estudio realizado para la selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos, aisladas de sedimentos del Caribe colombiano, obtuvieron resultados que discrepan con los antes expuestos, ya que, alcanzaron una fase exponencial que inició a partir del sexto día con 1.33×10^{9} UFC. Esto refuerza lo reflejado en la Fig. 12 y 13, demostrando el crecimiento rápido de las bacterias y en una cantidad significativa, principalmente en el pozo tres, que obtuvo, exactamente el mismo valor que señaló Narváez, 1.3×10^{9} UFC en menor tiempo (24 h). Las diferencias manifestadas en cuanto a el tiempo en el que empezó la fase exponencial, probablemente se deben a las características del suelo, ya que las muestras de suelo del Caribe colombiano fueron secas, mientras que las muestras de esta investigación fueron de la región Amazónica ecuatoriana que mayoritariamente posee suelos húmedos, otra razón importante pudo ser el tiempo que tenga el derrame en el suelo muestreado.

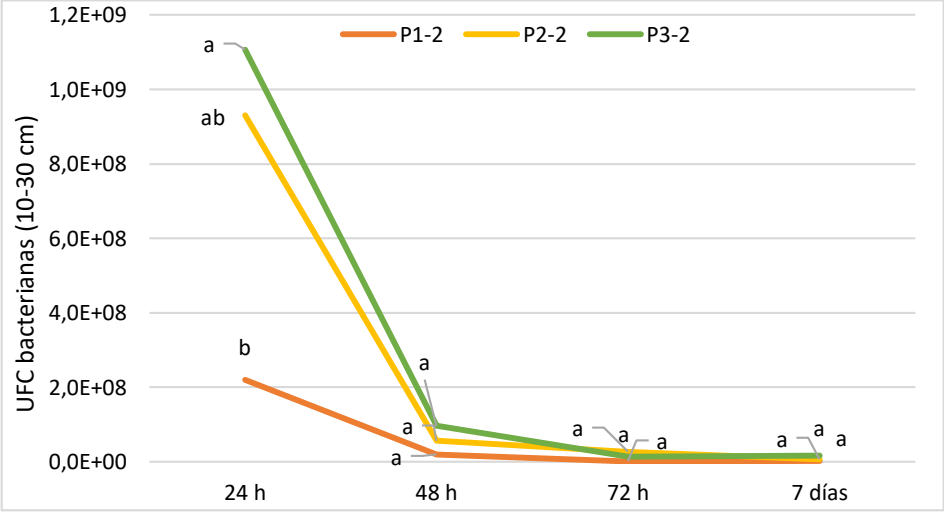


Figura 13. Cinética de crecimiento bacteriano por pozo en la profundidad 10-30 cm. Letras desiguales en las columnas difieren para $p<0.05$ por HSD Tukey. La nomenclatura Px-2 corresponde a P como pozo, x (número de pozo) y 2 profundidad 10-30 cm
Fuente: Elaboración propia

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

La caracterización morfo-cultural del Pozo 1 (4 meses) en la profundidad 0-10 cm posee predominancia en la apariencia de tipo barbado (C), con el 82.0%, en comparación con las otras clasificaciones, mientras que el 12.9% de las colonias correspondió a equinulado (B) y un 5% a una apariencia difusa (D) Tabla 6. En cuanto a la forma de las colonias, se determinó una alta variación, obteniéndose cinco tipos de formas, entre ellas: circular, irregular, filamentosa, lanceolada, y puntiforme, cuya dominancia estuvo en la forma circular que teniendo en cuenta el número de colonias bacterianas representó un 70.5% con respecto al total, seguido del 12.9% irregular, 10.1% filamentosa, 5.8% lanceolada y por último la forma puntiforme con 0.7%.

Destacó la presencia de dos tipos de elevación en las colonias, plana y elevada. De estas dos la más representativa fue la plana o también llamada aplastada con 61.2%. El porcentaje restante (38.8%) perteneció a elevada. La última característica según la metodología utilizada fue el borde, resaltando el borde ondulado con 69%, seguido del entero 18% y lobulado 13%.

Tabla 6

Caracterización morfo-cultural de las comunidades bacterianas del Pozo 1 con 4 meses de ocurrido el derrame, en la profundidad 0-10 cm

Comunidades bacterianas P1-4 meses (0-10 cm profundidad)				
		Características		
Apariencia	**Forma**	**Elevación**	**Bordes**	**UFC**
C	Circular	Plana	Entera	17
C	Circular	Plana	Ondulado	35
C	Puntiforme	Plana	Ondulado	1
B	Irregular	Plana	Lobulado	18
C	Lanceolada	Plana	Entero	8
C	Filamentosa	Plana	Ondulado	6
D	Circular	Elevada	Ondulado	6
D	Filamentosa	Elevada	Ondulado	1
C	Circular	Elevada	Ondulado	40
C	Filamentosa	Elevada	Ondulado	7
	Total			139

Nota. La nomenclatura P1 significa Pozo uno. UFC (Unidades Formadoras de Colonias). Equinulado (B), barbado (C), difuso (D). El número de UFC indica la cantidad de comunidades que tuvieron las mismas características

Fuente: Elaboración propia

En la profundidad 10-30 cm en el mismo pozo, hubo menos comunidades bacterianas que distinguiesen entre sí en comparación a la profundidad de 0-10 cm Tabla 7, por lo que en la apariencia del crecimiento bacteriano todas fueron de tipo barbado (C) representando el 100%. La forma fue de tres tipos circular, irregular y filamentosa, cuyos porcentajes fueron 60, 20 y 20% respectivamente. La elevación de las colonias fue plana en su totalidad, el borde ondulado fue el más representativo con un 80%, mientras que el entero o continuo obtuvo el 20%.

Tabla 7.

Caracterización morfo-cultural de las comunidades bacterianas del Pozo 1 con 4 meses de ocurrido el derrame, en la profundidad 10-30 cm

Comunidades bacterianas P1-4 meses (10-30 cm)				
		Características		
Apariencia	**Forma**	**Elevación**	**Bordes**	**UFC**
C	Circular	Plana	Ondulado	2
C	Circular	Plana	Entero	1
C	Irregular	Plana	Ondulado	1
C	Filamentosa	Plana	Ondulado	1
	Total			5

Nota. La nomenclatura P1 significa Pozo uno. UFC (Unidades Formadoras de Colonias). Barbado (C), difuso (D). El número de UFC indica la cantidad de comunidades que tuvieron las mismas características

Fuente: Elaboración propia

Estos resultados concuerdan con la investigación realizada por Guevara (2017), acerca de la identificación de microorganismos en el relleno sanitario del cantón Pastaza, en la que utilizaron un muestreo con una profundidad análoga a la de este trabajo, 10-15 cm, la caracterización morfo-cultural realizada en dicho estudio sustenta la predominancia de tipo barbado en la apariencia, el porcentaje de distinción en la forma de las colonias difiere con los expuestos en la Tabla 6, ya que resalta la forma filamentosa, de igual manera la elevación de las colonias bacterianas estudiadas en el relleno sanitario de Pastaza, es distinta ya que sobresale el tipo elevada. Por otra parte, hay coincidencia en el dominio del tipo de borde ondulado con un 78%.

Los resultados de la caracterización morfo-cultural del Pozo 2 (0-10 cm) se describen en la Tabla 8, el periodo de derrame de este pozo es de 5 años. Las comunidades bacterianas de 0-10 cm fueron mayoritariamente de apariencia barbada con el 82.1%, mientras que el 12.3% fue de tipo arborescente, la apariencia difusa obtuvo 5.6% siendo ésta la de menor representatividad en esta característica. El Pozo 2 a diferencia del 1, presentó tres tipos de

formas, circular, irregular y filamentosa, de las cuales la que más destacó fue la circular con 84%, mientras que, las dos formas restantes tuvieron 12 y 3.7% respectivamente.

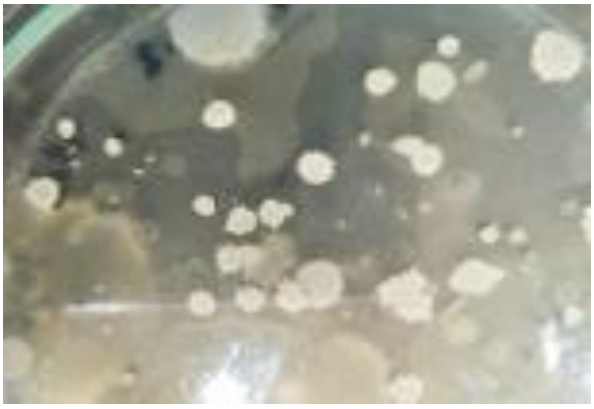


Figura 14. Colonias bacterianas caracterizadas morfo-culturalmente
Fuente: Elaboración propia

La elevación de las comunidades bacterianas fue plana y elevada, la elevación plana representó un 87% y la elevada un 13% con respecto al total, teniendo similitud con la dominancia de la elevación plana del pozo uno. Los bordes fueron entero con 61.1%, ondulado con 26.5% y lobulado con 12.3% de representatividad.

Tabla 8

Caracterización morfo-cultural de las comunidades bacterianas del Pozo 2 con 5 años de ocurrido el derrame, en la profundidad 0-10 cm

Comunidades bacterianas P2-5 años (0-10 cm profundidad)				
Características				
Apariencia	**Forma**	**Elevación**	**Bordes**	**UFC**
C	Circular	Elevada	Entero	18
C	Circular	Plana	Entero	81
C	Circular	Plana	Ondulado	34
E	Irregular	Plana	Lobulado	20
D	Circular	Elevada	Ondulado	3
D	Filamentosa	Plana	Ondulado	6
Total				162

Nota. La nomenclatura P2 significa Pozo dos. UFC (Unidades Formadoras de Colonias). Barbado (C), difuso (D), arborescente (E). El número de UFC indica la cantidad de comunidades que tuvieron las mismas características
Fuente: Elaboración propia

Las comunidades bacterianas que estuvieron presentes en la profundidad 10-30 cm, obtuvieron características similares a las del Pozo 1 de 0-10 cm en su apariencia, ya que ambos pozos, aunque en diferentes profundidades poseen apariencia barbada, equinulada y difusa, el

porcentaje correspondiente a barbada fue de 84%, equinulada 14% y de difusa el 1.7%. Se observaron cuatro tipos de formas en las colonias, de las cuales la circular tuvo mayor número de comunidades bacterianas, representado en 83.1%, la forma irregular obtuvo el 14.4%, filamentosa 1.7% y puntiforme 0.8%. La elevación que predominó fue la elevada con el 58.5% de comunidades con esta característica, el porcentaje restante perteneció a plana Fig. 15. Los bordes de las colonias en la profundidad 10-30 cm fueron ondulado, entero, filamentoso y lobulado, el más distintivo fue el borde ondulado, que obtuvo el 80.5%, mientras que el filamentoso tuvo el menor porcentaje entre los cuatro tipos de bordes, siendo éste 0.8% Tabla 9.



Figura 15. Elevación de tipo elevada y plana, predominante en P2 (0-10 cm)
Fuente: Elaboración propia

Gavilánez Buñay (2013), expuso resultados similares en su investigación, misma que fue realizada con muestras de suelo del bloque o campo Sacha, dentro de la parroquia San Carlos. La caracterización morfológica realizada en dicha investigación se basó en los tipos de forma, elevación y borde de una colonia, señalando la predominancia de la forma circular en las colonias, así como también la irregular, la elevación fue mayoritariamente de tipo plana, coincidiendo con los análisis anteriores, por otra parte, difiere en el pronunciamiento secundario de la elevación convexa, tanto en el pozo uno y dos. Además, presentaron dos tipos de borde, entero y ondulado.

Tabla 9.

Caracterización morfo-cultural de las comunidades bacterianas del Pozo 2 con 5 años de ocurrido el derrame, en la profundidad 10-30 cm

Comunidades bacterianas P2-5 años (10-30 cm profundidad)				
Características				
Apariencia	**Forma**	**Elevación**	**Bordes**	**UFC**
C	Circular	Elevada	Ondulado	62
C	Circular	Elevada	Entera	4
C	Circular	Plana	Ondulado	30
C	Puntiforme	Plana	Ondulado	1
C	Filamentosa	Elevada	Filamentoso	1
C	Filamentosa	Plana	Lobulado	1
D	Circular	Elevada	Ondulado	2
B	Irregular	Plana	Lobulado	17
Total				118

Nota. La nomenclatura P2 significa Pozo dos. UFC (Unidades Formadoras de Colonias). Equinulado (B), barbado (C), difuso (D). El número de UFC indica la cantidad de comunidades que tuvieron las mismas características
Fuente: Elaboración propia

Las características presentadas por las comunidades bacterianas del Pozo 3 en la profundidad 0-10 cm se encuentran en la Tabla 10, indicando que la apariencia barbada tuvo un alto número de colonias con esta característica, alcanzando a representar el 80.4% del total, seguida por la difusa con 13% y 6.5% la equinulada Fig. 16. La forma circular una vez más es la predominante con 87%, a su vez la forma lanceolada e irregular obtienen 6.5% cada una.

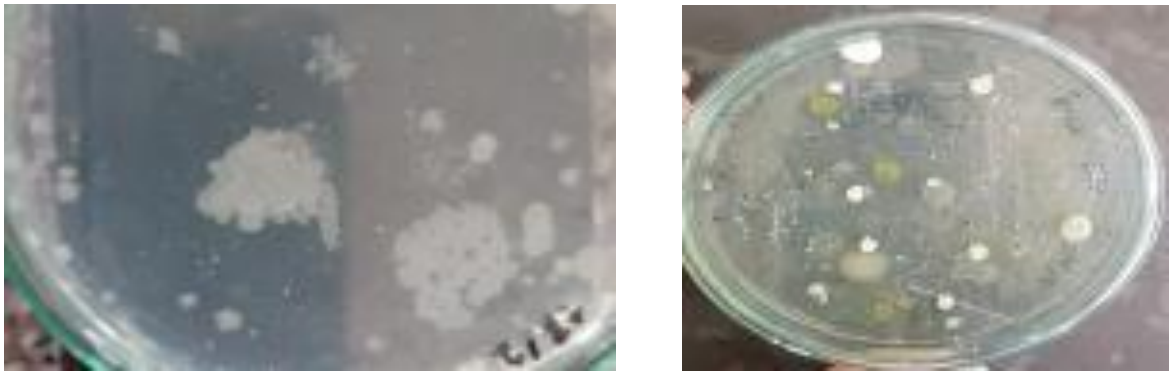


Figura 16. Características morfológicas del crecimiento de las comunidades bacterianas de P3 0-10 cm
Fuente: Elaboración propia

A diferencia de los tipos de elevación de los dos anteriores pozos el número tres, mostró elevaciones planas, elevadas y convexas bajas, sin embargo, no se observaron cantidades importantes de colonias convexas bajas ya que obtuvo únicamente el 19.6%, mientras la plana

logró un 63%. El borde más destacado fue el ondulado con 91.3% con respecto al total, lobulado 6.5% y entero 2.2%.

Tabla 10

Caracterización morfo-cultural de las comunidades bacterianas del pozo tres (10 años) en la profundidad 0-10 cm

Comunidades bacterianas P3-10 años (0-10 cm)				
		Características		
Apariencia	**Forma**	**Elevación**	**Bordes**	**UFC**
D	Circular	Elevada	Ondulado	3
C	Circular	Elevada	Entera	1
C	Circular	Convexa baja	Ondulado	9
D	Lanceolada	Elevada	Ondulado	3
C	Circular	Elevada	Ondulado	1
B	Irregular	Plana	Lobulado	3
C	Circular	Plana	Ondulado	26
	Total			46

Nota. La nomenclatura P3 significa Pozo tres. UFC (Unidades Formadoras de Colonias). Equinulado (B), barbado (C), difuso (D)

Fuente: Elaboración propia

La profundidad 10-30 cm del Pozo 3 contó con mayor número de comunidades bacterianas que la de 0-10 cm Tabla 11. La apariencia fue semejante a la anterior, su tipo barbado obtuvo 86.3%, equinulado 9.9% y difuso 3.8%, mientras que, en la forma, se evidencia claramente la dominancia de la forma circular sobre la irregular, mismas que representaron el 90.1 y 9.9% respectivamente. La elevación plana presidió a la elevada y a la convexa baja con 51.9%, se observaron bordes ondulados, enteros y lobulados de éstos hubo en mayor cantidad el ondulado 52.7%, entero 37.4% y lobulado 9.9%.

Tabla 11.

Caracterización morfo-cultural de las comunidades bacterianas del pozo tres (10 años) en la profundidad 10-30 cm

Comunidades bacterianas P3-10 años (10-30 cm)				
		Características		
Apariencia	**Forma**	**Elevación**	**Bordes**	**UFC**
C	Circular	Elevada	Ondulado	34
C	Circular	Convexa baja	Entera	24
C	Circular	Plana	Entera	25
D	Circular	Elevada	Ondulado	5
C	Circular	Plana	Ondulado	30
B	Irregular	Plana	Lobulado	13
	Total			131

Nota. La nomenclatura P3 significa Pozo tres. UFC (Unidades Formadoras de Colonias). Equinulado (B), barbado (C), difuso (D)

Fuente: Elaboración propia

4.3. Determinación de la diversidad de bacterias en los suelos contaminados con hidrocarburos en los diferentes periodos de los derrames

Una vez obtenidos los resultados de la caracterización morfo-cultural de las comunidades bacterianas, se realizó la determinación de la diversidad bacteriana por pozo y profundidad. Por medio del análisis de parámetros como: apariencia del crecimiento bacteriano, forma, elevación y borde de la colonia, mismos que permitieron definir el número de individuos diferentes en cada muestra. Los índices de Simpson (λ) y Shannon H' permitieron el estudio de los parámetros antes mencionados. La Fig. 17 muestra los resultados obtenidos en el Pozo 1, 2 y 3 en la profundidad de 0-10 cm.

La profundidad 0-10 cm en el Pozo 1 con periodo de derrame de 4 meses indica mayor diversidad que los dos pozos restantes, ya que posee un valor de 0.81 cercano a 1.00, como establece el índice de Simpson, así mismo, ocurre con el índice de Shannon, reflejando una vez más la diversidad que posee, aunque no alcance valores ≥ 3, el Pozo 1 es el más cercano con 2.72.

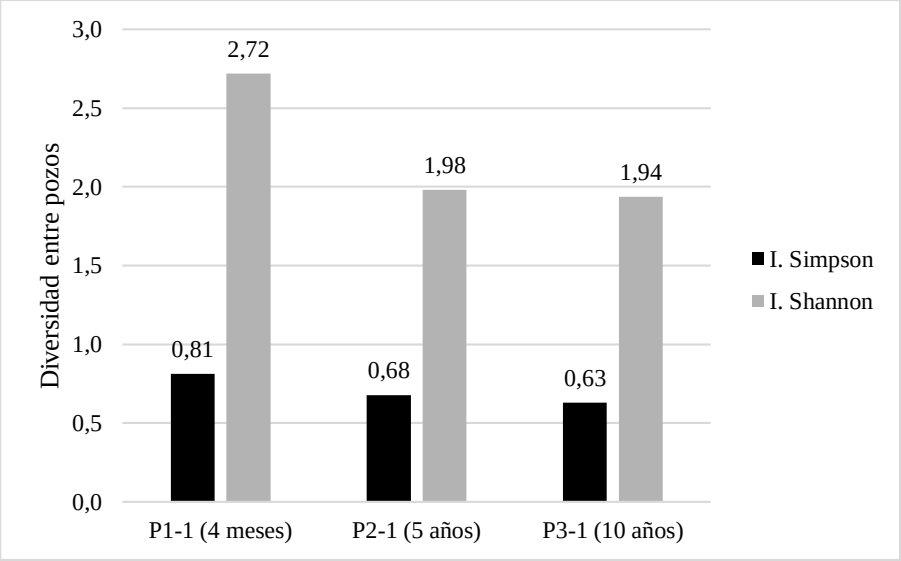


Figura 17. Diversidad de bacterias entre pozos en la profundidad 0-10 cm. El número uno, junto a la nomenclatura de los Px, x=número de pozo, representa la profundidad 0-10 cm
Fuente: Elaboración propia

Se reflejan los resultados de diversidad entre pozos en la profundidad de 10-30 cm Fig. 18. El Pozo 3 es el de mayor diversidad, siendo el más cercano a los rangos establecidos, tanto en el índice de Simpson como Shannon, obteniendo valores de 0.8 y 2.41 respectivamente. Sin embargo, la diferencia entre pozos no fue notoria principalmente entre P1-2 y P3-2 en el índice de Simpson.

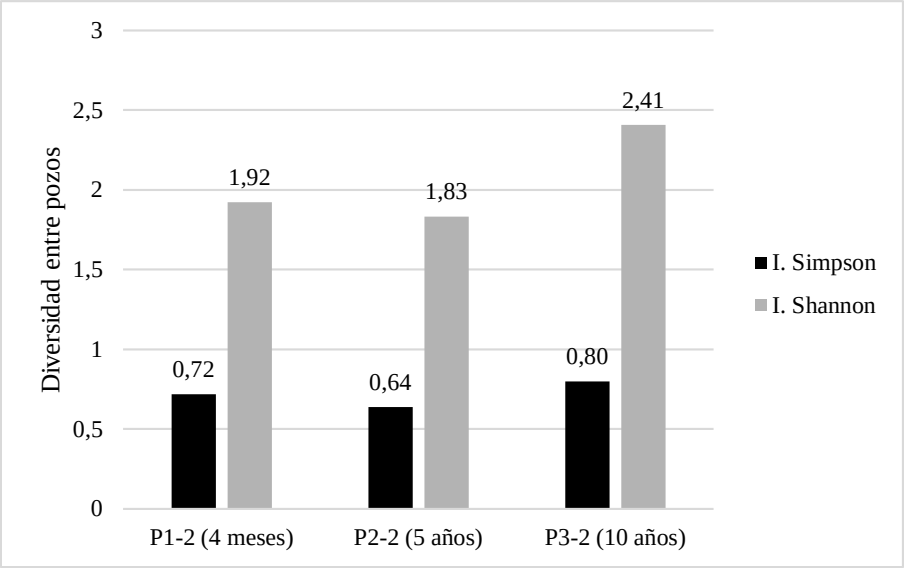


Figura 18. Diversidad de bacterias entre pozos en la profundidad 10-30 cm. El número dos, junto a la nomenclatura de los Px, x=número de pozo, representa la profundidad 10-30 cm
Fuente: Elaboración propia

Es de relevancia el comportamiento de las comunidades bacterianas, demostrado en la profundidad 0-10 cm, en donde el pozo uno de menor periodo de derrame (4 meses), se convierte en el más diverso, sin embargo, al incrementar la profundidad a 10-30 cm disminuye su diversidad. A diferencia de lo que ocurre en el pozo tres con mayor periodo de derrame (10 años) en el que, al aumentar la profundidad, la diversidad también crece. Por otro lado, el pozo dos (5 años) con un periodo de derrame que se aproxima al promedio del pozo uno y tres, no indica cambios importantes en su diversidad, se mantiene en ambas profundidades. Denotando de esta manera la influencia de la adaptabilidad al ambiente que tienen las comunidades bacterianas a lo largo del tiempo, en la diversidad (Anexos 4,5 y 6).

Estos resultados son importantes puesto que, permiten conocer las variaciones en la diversidad bacteriana por su adaptabilidad en el tiempo y en la profundidad del suelo. Creando una base de información sobre la influencia de estos factores en el crecimiento de las bacterias en sitios contaminados. Morelli, Coppotelli, y Panno (2015), mencionan que las estrategias de biorremediación deberían ser diseñadas en base al conocimiento de los microorganismos presentes en los ambientes contaminados, sus capacidades metabólicas, y la respuesta a los cambios en las condiciones ambientales, sin embargo, la falta de información sobre los factores que controlan el crecimiento y la actividad de los microorganismos en los ambientes contaminados, provocan resultados impredecibles en el proceso de remediación.

Al culminar el análisis de diversidad bacteriana entre pozos por profundidad de muestreo, se considera importante examinar la diversidad total de bacterias encontrada en los tres pozos

Fig. 19. La variación entre las cantidades resultantes no fue elevada, aun así, demuestran la existencia de una diversidad relativamente alta en las comunidades bacterianas de cada pozo. A través del índice de Simpson se determina que el pozo más diverso es el número uno (P1) con un periodo de cuatro meses de ocurrido el derrame, el pozo tres (P3) obtuvo valores cercanos, la diferencia fue de 0.06, mientras que el pozo dos (P2) difirió con 0.11, sin dejar de estar en un rango que indica diversidad.

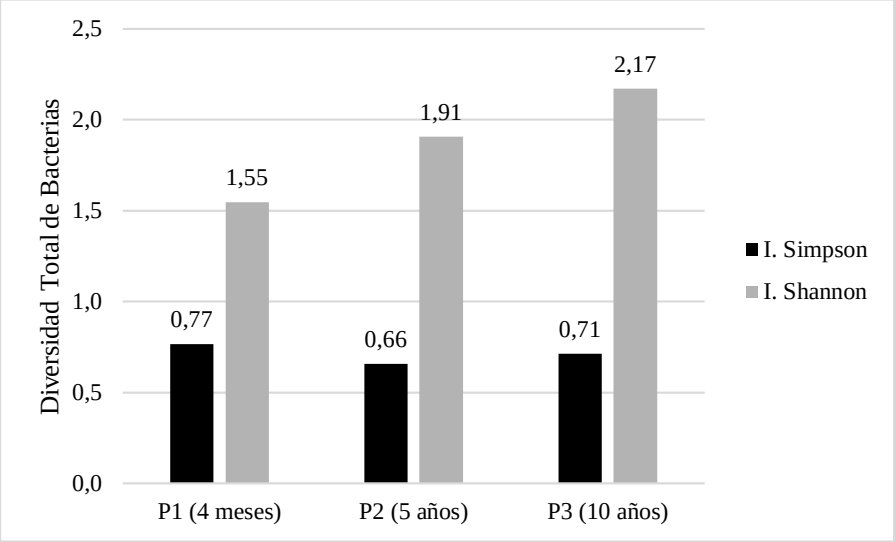


Figura 19. Diversidad total de bacterias entre pozos determinada por el Índice de Simpson y Shannon
Fuente: Elaboración propia

Por otra parte, el índice de Shannon señala al pozo tres como más diverso, ya que es el más cercano a 3, a diferencia del índice de Simpson que como se menciona anteriormente, establece al pozo uno como más diverso, esto se debe, a los contrastes específicos entre índices. El índice de Simpson al ser un índice de dominancia determinó la diversidad bacteriana en base a la representatividad de las especies más dominantes, mientras que el índice de Shannon evalúa la equidad es decir la uniformidad de los valores de importancia de todas las especies, la riqueza de especies (número de especies) y su abundancia.

Por esto, es importante considerar el perfil del suelo, es notorio que mientras el periodo de derrame y la profundidad (horizontes) sean mayores, las bacterias tienden a mantenerse uniformes, con el mismo valor de importancia, por lo tanto, diversas. Además, se observa la capacidad de filtración que puede llegar a tener el hidrocarburo en el suelo. Indica Cortón & Viale (2006), que el petróleo se mueve hacia las capas (horizontes) subyacentes del suelo, pudiendo alcanzar el nivel de las aguas subterráneas. Debido a ello es necesario conocer que

parte del perfil del suelo se ve afectada con el derrame o depósitos de tratamiento (landfarming), facilitando la aplicación de las técnicas apropiadas de remediación.

Schroeder, Rodríguez, y Hernández (1999), señala que antes de empezar un proyecto de biorremediación es preferible realizar un estudio de factibilidad para caracterizar las propiedades específicas del sitio, la caracterización de las propiedades físico-químicas del material (suelo, lodo, sedimento) a tratar y del contaminante, y la determinación del potencial de los microorganismos del sitio para descomponer los hidrocarburos.

Los resultados mencionados en esta investigación se convierten en los primeros con estas características, generando un precedente para futuros estudios, que contribuyan a la recuperación y conservación de suelo contaminado con hidrocarburos. Aportan directamente a la región Amazónica, pues acoge mayoritariamente a pozos de explotación petrolera, principalmente la provincia de Orellana y Sucumbíos, por su puesto también la parroquia San Carlos.

La cinética de crecimiento, cuantificación y diversidad de las comunidades bacterianas encontradas en los tres pozos estudiados con sus respectivos periodos de derrame, demostraron que mientras más tiempo se encuentren las colonias bacterianas en el suelo contaminado, mayor adaptación tendrán. Lo que sugiere para posteriores tratamientos de biorremediación, el uso de bacterias nativas expuestas por largos periodos, ya que, su crecimiento, diversidad y adaptación se ve más garantizada al momento de inocularse en otros medios. Es importante, continuar realizando este tipo de estudios previos a la ejecución de técnicas de recuperación, debido a que, de esta manera se evita la ineficiencia de la técnica a emplearse.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- El periodo de derrame para cada pozo, P1 (cuatro meses), P2 (cinco años), P3 (diez años), influyó directamente en la cuantificación y cinética de crecimiento de las comunidades bacterianas, ya que, cuanto más tiempo tiene el contaminante en el suelo, posibilita una mayor adaptación de las bacterias a esos cambios en el ambiente y aumentan sus individuos, creciendo exponencialmente en otros medios y en poco tiempo. El pozo tres con un periodo de derrame de 10 años obtuvo 1.3×10^{9} UFC, valor superior a los expresados por los otros dos pozos, la cinética de crecimiento fue exponencial para los tres pozos, sin embargo, sobresalió P3 con un pico elevado en 24 horas.
- Las comunidades bacterianas aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos desde hace 4 meses, 5 y 10 años se caracterizaron morfo-culturalmente por la predominancia de la apariencia barbada en los tres pozos con porcentajes superiores al 80%, la forma circular (>60%), elevación plana en los pozos uno y tres (>60%), la profundidad de 10-30 cm del pozo dos difirió de los anteriores en esta característica cuya dominancia fue la elevada (58,5%), por último, el borde ondulado (>60%) fue el más representativo.
- La diversidad bacteriana encontrada en los tres pozos fue significativa según el Índice de Simpson y el Índice de Shannon, se determinó que el pozo más diverso fue el uno, con cuatro meses de ocurrido el derrame, mismo que obtuvo 0.77 para Simpson, muy cercano a 1, seguido por el pozo tres con una diferencia de 0.06. El índice de Shannon reflejó que el pozo tres con un periodo de derrame de 10 años, demostró tener uniformidad en los valores de importancia de las especies, por tanto, es el más diverso (2.17 de 3). Los resultados expuestos son los primeros que se obtienen sobre comunidades bacterianas de tres pozos en diferentes periodos de derrames en la parroquia San Carlos, sirviendo como base de investigaciones posteriores.

5.2. Recomendaciones

- Emplear comunidades bacterianas provenientes de zonas con mayor periodo de derrame ya que, éstas tienen mejor adaptación al ambiente, siendo funcionales para futuras técnicas de biorremediación o en estudios similares.
- Realizar la secuenciación genómica de las comunidades bacterianas más relevantes de esta investigación, para la evaluación de su potencial degradador de hidrocarburos en el suelo, facilitando el uso y elección de estrategias de biorremediación.
- Efectuar investigaciones semejantes en áreas con pasivos ambientales principalmente en la región Amazónica ecuatoriana que contribuyan en su remediación y recuperación.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarez, J. M. (2011). Definición de Bacteria. Enciclopedia Salud: Página web en línea] Disponible en http://www. enciclopediasalud. com ….

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

Arteaga, A. (2003). Indicadores de gestión e impactos de la actividad petrolera en la

Región Amazónica Ecuatoriana. 51-77.

Benintende, S. S., Cecilia. (2000). Microorganismos del suelo. *Universidad Nacional de Entre*.

Cabrera, R. (2017). *ANÁLISIS DE LAS CONCENTRACIONES DE METALES PESADOS E HIDROCARBUROS EN EL PERÍODO 2015-2016 EN SEDIMENTO DE LA ZONA INTERMAREAL DE SANTA ELENA Y MANABÍ, ECUADOR.*

Carmen Rivera, M., Ferrera, R., Volke, V., Luis, F., y Rodríguez. (2002). Adaptación y selección microbiana autóctona en medios de cultivo enriquecidos con Benzo (a) Pireno. *Agrociencia*, *36*(5), 503-514.

Casanova, E. (2005). Introducción a la ciencia del suelo. *UCV-CDCH. Caracas, Venezuela*.

Castro-Mancilla, Y. V., Castro-Meza, B. I., de la Garza-Requena, F. R., Rivera-Ortiz, P., Heyer-Rodríguez, L., y Ortiz-Carrizales, Y. P. (2013a). Variación de las poblaciones microbianas del suelo por la adición de hidrocarburos. *Terra Latinoamericana*, *31*(3), 221-230.

Castro-Mancilla, Y. V., Castro-Meza, B. I., de la Garza-Requena, F. R., Rivera-Ortiz, P., Heyer-Rodríguez, L., y Ortiz-Carrizales, Y. P. (2013b). Variación de las poblaciones microbianas del suelo por la adición de hidrocarburos. *Terra Latinoamericana, 31*, 221-230.

Cortón, E., y Viale, A. (2006). Solucionando grandes problemas ambientales con la ayuda de pequeños amigos: las técnicas de biorremediación. *Revista Ecosistemas, 15*(3).

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

Escalante, A. (2007). Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas *Ecología molecular* (pp. Cap 12. 412-413). México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Fadda, A. G. S. (2003). Introducción a la Edafología. *Consultado el*, *9*.

Fadda, G. (2017). Evolución del concepto suelo. *Introducción a la edafología.* (pp. 2-4). Tucumán.

Fernández, C. M. D. P. I. (2009). Las palabras de la selva. Estudio psicosocial del impacto de las explotaciones petroleras de Texaco en las comunidades amazónicas de Ecuador. .

Ferriol Molina, M., y Merle Farinós, H. B. (2012). Los componentes alfa, beta y gamma de la biodiversidad. Aplicación al estudio de comunidades vegetales.

GADPO, G. A. D. P. d. O. (2011). Plan de Desarrollo de la Provincia de Orellana. *Caracterización Provincial*.

GADPRSC. (2015). PDOT SAN CARLOS.

Gamboa Mariñas, M. (2019). El suelo, tipos de suelo y su composición.

Gavilánez Buñay, T. C. (2013). *Determinación de la biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para uso potencial en biorremediación.* Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos ….

González, J. M. T., Pulido, J. D. M., y Mora, M. A. T. (2018). El recurso suelo; un análisis de las funciones, capacidad de uso e indicadores de calidad. *RIAA, 9*(2), 3.

Guamán, F., Torres, R., y Nápoles, K. G. M. (2016). Aislamiento y caracterización de rizobios de Crotalaria sp. En el sur de Ecuador. *Cultivos Tropicales. Vol. 37*, 3.

Guevara, P. R. M. J. C. D. (2017). *Identificación de microorganismos en el relleno sanitario del cantón Pastaza* (Ingeniería Ambiental), Universidad Estatal Amazónica, Pastaza. Retrieved from https://www.academia.edu/37068337/CARACTERIZACI%C3%93N_MORFOCULTURAL_E_IDENTIFICACI%C3%93N_DE_MICROORGANISMOS_DEL_RELLENO_SANITARIO_DEL_CANT%C3%93N_PASTAZA

Hernández-Acosta, E. d. C. G.-C., María Rubiños-Panta, Juan Enrique y Alvarado-López, Jorge. (2006). Caracterización del suelo y plantas de un sitio contaminado con hidrocarburos. *Terra Latinoamericana, 24*(4), 463-470.

Hernández, A., Ascanio, M., Morales, M., Bojórquez, I., García, N., y García, D. (2008). *El suelo: Fundamentos sobre su formación, los cambios globales y su manejo*: Univ. Autónoma de Nayarit.

Herrera, J., y Peña, S. J. C. (2019). Participación de gobiernos subnacionales en la gobernanza del sector petrolero en Ecuador: El caso Napo y Orellana. *Grupo Faro*, 13-14.

Ibañez Asensio, S., y Moreno Ramón, H. (2019). Procesos formadores de suelo.

Ibañez, C., y 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.

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.

Mendoza, R. B., & Espinoza, A. (2017). Guía Técnica para muestreo de suelos.

Merino, L. (2009). Fisiología bacteriana. *Universidad Nacional del Nordeste, 2*, 47-50.

Mora-Donjuán, C. A., Burbano-Vargas, O. N., Méndez-Osorio, C., y Castro-Rojas, D. F. (2017). Evaluación de la biodiversidad y caracterización estructural de un Bosque de Encino (Quercus L.) en la Sierra Madre del Sur, México. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú, 14*(35), 68-75.

Morelli, I., Coppotelli, B., y Panno, L. (2015). La biorremediación en la era post-genómica. *Quimica Viva, 14*, 26-35.

Moreno, C. (2001). Índices de diversidad *Métodos para medir la biodiversidad* (pp. 41-43). España: CYTED.

Narváez, S., y L. Gómez, M. M., María M. (2008). SELECCIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD DEGRADADORA DE HIDROCARBUROS AISLADAS A PARTIR DE SEDIMENTOS DEL CARIBE COLOMBIANO. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR, 37*, 61-75.

Ortíz-Maya, J., Escalante-Espinosa, E., Fócil-Monterrubio, R. L., Ramírez-Saad, H. C., y Díaz Ramírez, I. J. (2017). Dinámica de poblaciones bacterianas y actividad deshidrogenasa durante la biorremediación de suelo recién contaminado e intemperizado con hidrocarburos. *Revista internacional de contaminación ambiental, 33*(2), 237-246.

Ortiz, E., Núñez, R., Fonseca, E., Oramas, J., Almazán, V., Cabranes, Y., . . . Díaz, Y. (2005). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Pacheco, F. A., y Carriel, L. A. M. (2019). *Bacterias degradadoras de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con hidrocarburos.* Paper presented at the Biblioteca Colloquium.

Pedrique, M. C., N. (2008). Reproducción y Crecimiento Microbiano. *Catedra de Microbiologia-Facultad de Farmacia (págs. 1-23). UCV.*

Peet, R. K. (1974). The measurement of species diversity. *Annual review of ecology and systematics*, 285-307.

Raffino, M. E. (2019). Método Analítico. from https://concepto.de/metodo-analitico/

Rodríguez, E. (2016). Caracterización molecular de comunidades bacterianas de la cuenca hidrográfica "El Carmen"-Loja. Loja: Universidad Nacional de Loja.

Schroeder, R. H. A., Rodríguez, V. I. D., y Hernández, L. G. (1999). Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Terra Latinoamericana, 17*(2), 159-174.

Silva, R. M. P., Pozo, M. I. C., de Oca, J. M. G. M., Rodríguez, A. Á., Viñas, M., y Moreno, D. C. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de

hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 39*(1), 44-51.

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.

Soler, E., Berroterán, P., Gil, J., y Acosta, R. (2012). Índice valor de importancia, diversidad y similaridad florística de especies leñosas en tres ecosistemas de los llanos centrales de Venezuela. *Agronomía Trop, 62*(1-4), 25-37.

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

Varela, G., y Grotiuz, G. (2008). Fisiología y metabolismo bacteriano. *Uruguay, Editorial Cefa*, 43-58.

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

Zamora, A., Ramos, J., y Arias, M. (2012). Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro, 24*(1), 5-12.

ANEXOS

Anexo 1. Toma de muestras y etiquetado



Imagen 2. Toma de la muestra compuesta realizada en el pozo uno.



Imagen 2. Conservación de las muestras en bolsas ziploc con su respectivo etiquetado para su posterior transporte al laboratorio de microbiología de la UEA

Anexo 3. Comparación por tiempos del crecimiento de las comunidades bacterianas en tres pozos (0-10 cm) de la parroquia San Carlos-Orellana

Comparación de tiempos					
Trat 0-10	Repl.	24h	48h	72h	7 días
1	1	1,14E+08	1,90E+06	1,20E+06	2,00E+07
1	2	3,20E+06	1,30E+06	1,60E+06	1,30E+08
1	3	2,30E+06	1,30E+06	5,00E+05	6,00E+07
2	1	5,00E+07	3,00E+07	2,00E+07	4,00E+07
2	2	3,00E+07	5,00E+07	2,00E+07	3,00E+07
2	3	3,90E+08	2,00E+07	3,00E+07	0,00E+00
3	1	5,50E+08	6,00E+07	3,00E+07	3,00E+05
3	2	6,20E+08	4,00E+07	2,00E+07	0,00E+00
3	3	1,60E+09	9,00E+07	9,00E+07	0,00E+00

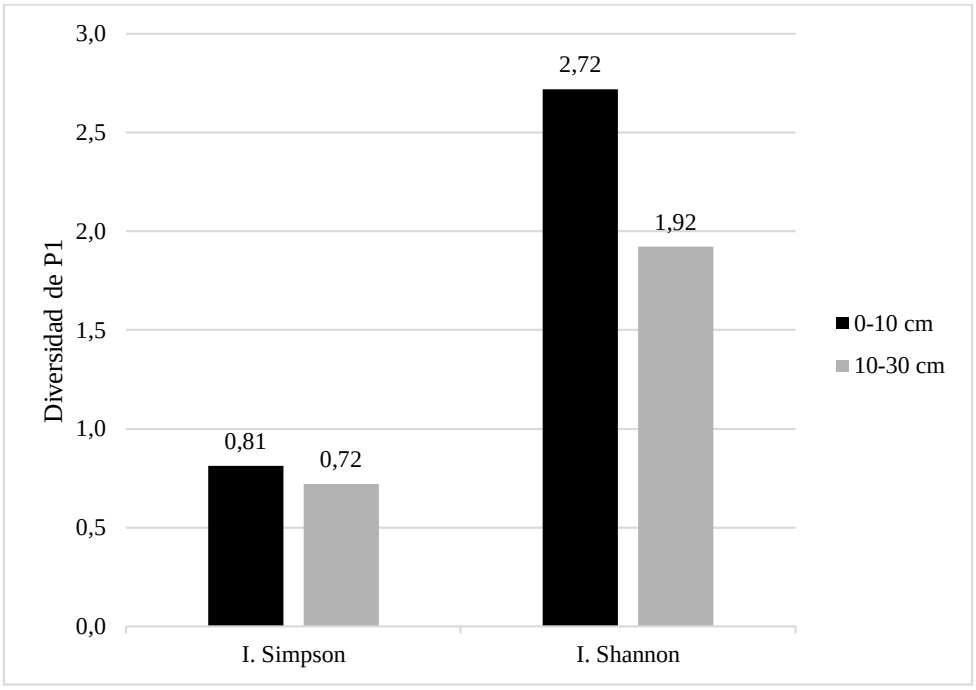
Nota. La división de cada pozo en tres réplicas hace referencia a las diluciones 1=10^{-5}, 2=10^{-6}, 3=10^{-7})
Fuente: Elaboración propia

Anexo 4. Comparación por tiempos del crecimiento de las comunidades bacterianas en tres pozos (10-30 cm) de la parroquia San Carlos-Orellana

Comparación de tiempos					
Trat 10-30	Repl.	24h	48h	72h	7 días
1	1	3,30E+08	5,00E+07	1,00E+06	6,00E+06
1	2	3,30E+08	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1	3	0,00E+00	1,00E+07	3,00E+06	0,00E+00
2	1	1,33E+09	3,00E+07	1,00E+07	1,00E+07
2	2	1,02E+09	5,00E+07	2,00E+07	1,00E+07
2	3	4,40E+08	9,00E+07	5,00E+07	0,00E+00
3	1	1,17E+09	8,00E+07	2,00E+07	2,00E+07
3	2	1,24E+09	1,50E+08	1,00E+07	3,00E+07
3	3	9,10E+08	6,00E+07	1,00E+07	0,00E+00

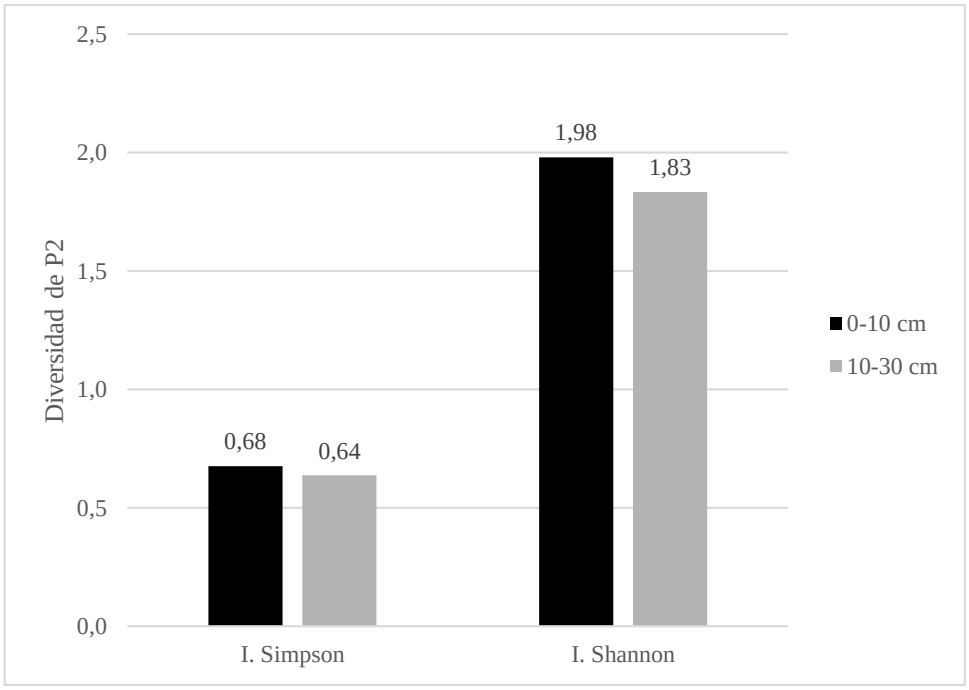
Nota. La división de cada pozo en tres réplicas hace referencia a las diluciones 1=10^{-5}, 2=10^{-6}, 3=10^{-7})
Fuente: Elaboración propia

Anexo 5. Diversidad bacteriana por profundidad de P1



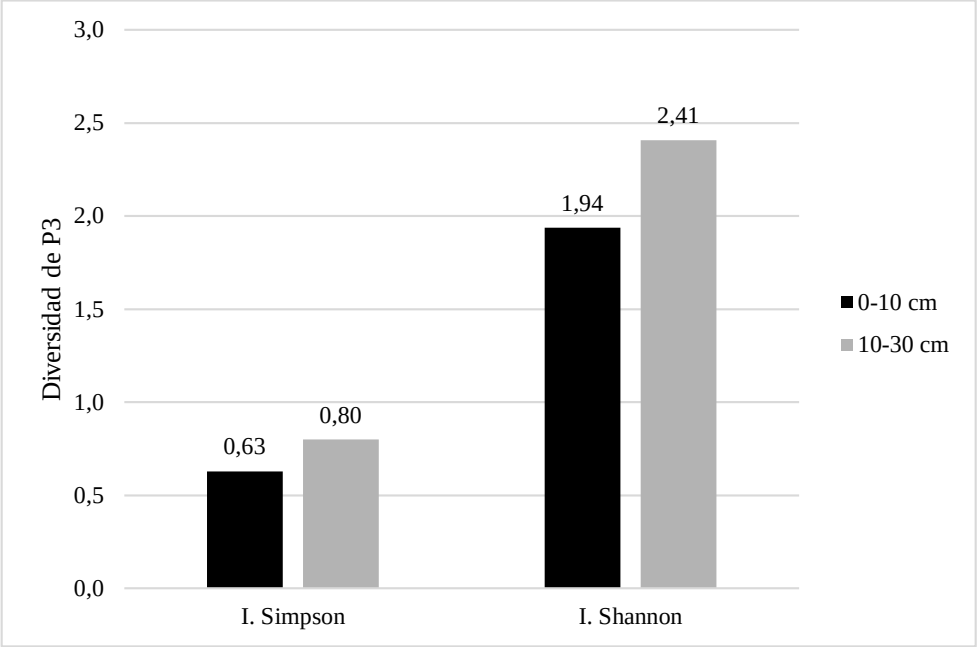
Fuente: Elaboración propia

Anexo 6. Diversidad bacteriana por profundidad de P2



Fuente: Elaboración propia

Anexo 7. Diversidad bacteriana por profundidad de P3



Fuente: Elaboración propia