



**“CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA EN SUELOS
CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS, DE TIPO PSEUDOMONAS
EN EL SECTOR RIO BONANZA, PROVINCIA DE PASTAZA.”**

¹M.S. Maposita, ¹W.O. Calle, ¹C.M. Fiallos, ¹F.Burgos
Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar,
Escuela Superior Politécnica del Litoral, Km. 30.5 vía Perimetral
Guayaquil-Ecuador
mmoposit@espol.edu.ec, wcalles@espol.edu.ec, mfiallos@espol.edu.ec, faburgo@espol.edu.ec

Resumen

La caracterización microbiológica en suelos contaminados por hidrocarburos permite obtener cepa(s) con características biorremedadoras obtenidas a partir de colonias aisladas en muestras de lodo-suelo contaminados por hidrocarburos en el sector Río Bonanza en la provincia de Pastaza.

Se espera que dentro de los generos aislados se encuentre el grupo Pseudomonas o bacterias lactosa positiva quienes han sido reportados como microorganismo capaces de metabolizar los derivados químicos producto de la degradación de hidrocarburos que finalmente podrían ser utilizados como herramientas de manejo ambiental cuando existan suelos contaminados por hidrocarburos.

Abstract

The microbiological characterization in hydrocarbons contaminated soils can obtain strain(s) with characteristic biorremedadoras obtained from colonies growing on sludge-soil samples contaminated by hydrocarbons sector Bonanza River in the Province of Pastaza.

It is expected that within the genera group is isolated Pseudomonas or lactose-positive bacteria, who have been reported as a microorganism capable of metabolize from chemists product of degradation by hydrocarbons finally be able to be used as an environmental management tools when hydrocarbons contaminated soils exist .

Keywords: bioremediation, hydrocarbons, bacteria Pseudomonas, aerobic bacteria, large negative strains, cultivated morphotypes.

1. Introducción

La industria petroquímica es importante en toda sociedad, no obstante, la falta de un programa de protección ambiental hace que el medio se vuelva más frágil ante derrames de petróleo por el deterioro de oleoductos, descargas de efluentes contaminados [1].

Existen microorganismos como levaduras, hongos o bacterias que degradan una gran cantidad de sustancias tóxicas, reduciendo su carácter nocivo o, incluso volviéndolas inocuas para el medio ambiente [4].

La selección de microorganismos a través de pruebas sucesivas de crecimiento poblacional en cultivos puros ricos en petróleo, es una estrategia eficiente para evaluar la adaptación y supervivencia de bacterias tolerantes a elevadas concentraciones de petróleo. Los resultados de estas pruebas confirman la selección de las bacterias más tolerantes y adaptadas, dependiendo de estas el éxito en las siguientes etapas de tratamiento tanto de suelos como de aguas contaminadas con petróleo [3].

El presente trabajo tuvo como objetivos fundamentales aislar e identificar bacterias, con capacidad para biodegradar fracciones de petróleo y seleccionar la de mayor capacidad biodegradadora como una alternativa para la solución de los problemas de contaminación generados por este mineral en la industria petrolera ecuatoriana [2]. Mecanismo conocido como biorremediación, que consiste en acelerar el proceso natural, para mitigar la contaminación ambiental. [3].

2. Marco Teórico.

2.1. Diversidad Microbiana.

2.1.1. Diversidad Microbiana en ambientes contaminados. Los suelos contaminados contienen gran cantidad de microorganismos que pueden incluir un número de bacterias y hongos capaces de utilizar hidrocarburos, que representan un uno por ciento (1%) de la población total de aproximadamente 10⁴ a 10⁶ células por gramo de suelo[5].

También, se han encontrado cianobacterias y algas capaces de degradar hidrocarburos. Los suelos contaminados con hidrocarburos contienen más microorganismos que los suelos no contaminados, pero su diversidad microbiana es más reducida[5].

2.1.2 Biorremediación. La biorremediación es el proceso utilizado por el hombre para detoxificar variados contaminantes en los diferentes ambientes mares, estuarios, lagos, ríos y suelos usando de forma estratégica microorganismos, plantas o enzimas de estos [5]. Esta técnica es utilizada para disminuir la contaminación por los hidrocarburos de petróleo y sus derivados, metales pesados e insecticidas; además se usa para el tratamiento de aguas domésticas e industriales, aguas procesadas y de consumo humano, aire y gases de desecho [5]. Afortunadamente la biotecnología ha permitido el desarrollo de diversas estrategias que pueden ser utilizadas con el fin de restaurar el suelo y la calidad ambiental, de acuerdo con las necesidades y dimensiones del problema, pero en general no hay una “fórmula secreta” que garantice el éxito de la biorremediación [5].

2.1.3. Importancia del pool microbiano. La formulación de un pool microbiano permite combinar y complementar sus funciones metabólicas para que colectivamente biodegraden un compuesto. En muchos casos algunos morfotipos sólo pueden realizar una parte de toda una cadena de reacciones químicas para llegar a compuestos que puedan ser fácilmente utilizados por los organismos del mismo consorcio u otros que estén presentes en el ambiente [5]. Además, al estar en grupo los morfotipos pueden tolerar los cambios físico-químicos que se den en el ambiente durante el proceso de biorremediación[5]. Cabe aclarar que se necesita un análisis más profundo para la identificación de los morfotipos que serán usados [5].

2.2. Descripción de las bacterias degradadoras de petróleo.

Se les da este nombre a un grupo de bacterias capaces de utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono; la mayoría de las bacterias conocidas hoy en día con esta capacidad fueron aisladas de zonas contaminadas como por ej. Suelos cercanos a refinerías o donde se conozcan derrames de hidrocarburos[6]. Entre las bacterias más importantes encontramos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia rubidae*, *Bacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Spirillum sp.*, *Xanthomonas.*, *Alcaligenes sp.*, etc [6].

2.2.1 Uso de las Bacterias degradadoras de hidrocarburos. Posible alternativa para la limpieza de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos [6].

Las bacterias degradadoras de petróleo pueden actuar en ambientes **Aerobios** o **Anaerobios**, y que cada caso lo hacen vía diferentes rutas metabólicas. En el caso de los ambientes anaerobios aún no se conoce con gran exactitud que vías metabólicas utilizan; sin embargo en ambientes aerobios las rutas están bien documentadas [6].

2.2.2 Degradación de hidrocarburos alifáticos en presencia de oxígeno. Se trata de reacciones de oxidación e hidrólisis y da como producto ácido carboxílico [6].

2.2.3. Degradación de hidrocarburos aromáticos en presencia de oxígeno. La vía metabólica se centra en la transformación del catecol; y produce como resultado succinil CoA. [6].

2.2.4. Genero Pseudomonas. El género *Pseudomonas* está constituido por bacilos Gram negativos, móviles por flagelación polar. Se encuentra normalmente en el suelo y son patógenos oportunistas en animales, plantas y humanos. Entre los microorganismos del género *Pseudomonas* degradadores de hidrocarburos, se encuentra la especie *aeruginosa*, conocida como bacilo pirocánico o de pus azul [7]. Es un bacilo recto o ligeramente curvado, Gram negativo, con olor dulce y aromático debido a la producción de trimetilamina. *Pseudomonas aeruginosa* causa al hombre distintos problemas, pero esta bacteria también tiene diversas aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en el área ambiental[7].

Así, se sabe que es uno de los pocos organismos capaces de degradar alcanos de cadena ramificada, produce biosurfactantes que son útiles para la limpieza de aguas contaminadas con hidrocarburos y además posee la capacidad de absorber metales pesados tales como Pb, Cr y Zn. Cuando, estas bacterias se adhieren a una superficie, las células se diferencian por formar microcolonias cubiertas por una matriz extracelular que eventualmente llegan a constituir una película[7].

Las bacterias que forman la biopelícula tienen un metabolismo distinto a las células que crecen en medios líquidos, uno de las diferencias más aparentes es su disminuida sensibilidad a antibióticos y otros agentes tóxicos[7].

2.3. Hidrocarburos

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos formados únicamente por átomos de carbono e hidrógeno. Consisten en un armazón de carbono al que se unen átomos de hidrógeno. Forman el esqueleto de la materia orgánica. También están divididos en abiertas y ramificadas [8].

Los hidrocarburos se dividen en 2 que son aromáticos y alifáticos. Los alifáticos son alcanos, alquenos y alquinos cuyas fórmulas generales son C_nH_{2n+2} , C_nH_{2n} y C_nH_{2n-2} , respectivamente [8].

2.3.1. Degradación de hidrocarburos alifáticos en presencia de oxígeno. Los hidrocarburos alifáticos los podemos clasificar en alcanos, alquenos y alquilos dependiendo de lo saturados que estén sus enlaces.

Como norma general decir que como mas insaturado sea una cadena carbonatada (más dobles y triples enlaces) más difícil o lenta será su degradación. De igual manera los alcanos de cadena larga son más resistentes a la biodegradación a medida que la longitud de su cadena aumenta [9].

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

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

La mayoría de los microorganismos en teoría si son capaces de sobrevivir en ese ambiente en ese ambiente pueden degradar sin más problemas hidrocarburos de cadena larga [9].

2.3.2 Hidrocarburos aromáticos. Los hidrocarburos aromáticos polinucleares (PAH) son contaminantes muy frecuentes en el medioambiente y que suponen un serio riesgo para la salud humana y para los ecosistemas. El acoplamiento de tecnologías químicas y biológicas en los procesos de biorremediación ha permitido, mediante el empleo de surfactantes, aumentar la biodisponibilidad de estos contaminantes de carácter hidrófobo a los microorganismos capaces de biodegradarlos [10].

Por lo general se detallan los mecanismos de biodegradación aeróbica de estos contaminantes y de actuación de los surfactantes para aumentar la biodisponibilidad y, por tanto la biodegradación.

3. Principales Impactos.

3.1. Impacto Científico.

Establecer la identificación de bacterias en el suelo contaminados por petróleo del Río Bonanza, con la finalidad de caracterizar, aislar e identificar las bacterias que crecen sobre el hidrocarburos para ser reintroducidas, con la finalidad de neutralizar sustancias tóxicas y transformarlas en sustancias menos tóxicas para el ambiente o salud humana [11].

3.2. Impacto Social.

Esta investigación va encaminada a sustentar que se desarrollen y obliguen a las leyes ambientales operaciones hidrocarbúferas en el Ecuador, para que las autoridades tomen las correcciones necesarias para que mientras se explota el petróleo que es muy necesario para la economía del país, no se llegue a destruir la fauna, con especies únicas, de nuestra amazonia y no se llegue a dañar el ecosistema existente [12].

La actividad petrolera ha afectado en especial a los pueblos alrededor del Río Bonanza: Sicono, Secoya, Cofán y quichua, que han perdido gran parte de sus territorios tradicionales y sus posibilidades de sobrevivencia cultural. Sus prácticas están amenazadas por la contaminación de los ríos y la destrucción de los suelos, pérdida de sus cosechas, muerte de animales de caza y pesca y la invasión de colonos [12].

Por una calidad de vida libre del entorno de sustancias tóxicas [12].

3.3. Impacto Ambiental.

Los daños causados por las explotaciones petroleras en la naturaleza se dan en el aire, recursos hídricos, flora y fauna [12].

La explotación de hidrocarburos es una actividad cada vez más importante, y su impacto ambiental puede aumentar considerablemente, la tierra amazónica ha sido depredada y envenenada, los ríos amazónicos podrían convertirse en corrientes que llevan cargamentos de basura química, los bosques dejarían de ser una realidad y los animales, tanto como los seres humanos tendrían que emigrar a lugares menos inhabitados, o en su defecto, resignarse a la desaparición lenta e irreversible. Los pueblos indígenas se verían muy beneficiados si el control ambiental para las explotaciones aumentara [12].

Las empresas responsables del proceso extractivo de energéticos jamás han respetado a la naturaleza de la zona de explotación, éstas deberían parar la contaminación e incrementar la eficiencia de sus operaciones en los campos petroleros existentes

mediante la utilización de una tecnología más adecuada. El Estado debe ser el principal garante del derecho a vivir en un ambiente libre de contaminación. Toda iniciativa en beneficio del desarrollo de una cultura ecológica siempre será plausible [12].

4. Metodología.

4.1 Área de Estudio.

4.1.1. Ubicación. Se halla en la provincia de Pastaza, Zona central de la Región Amazónica, entre los 75° 35' y 78° 5' de longitud oeste y entre los 1° 20' y 2° 35' de latitud sur. Su cabecera cantonal y provincial a la vez se halla localizada a lo 78° 07' de longitud oeste y 1° 30' de latitud sur, a una distancia de 101 Km. A 2H00 de la ciudad de Ambato, 5H00 de la ciudad de Quito y a 3H00 de la ciudad de Riobamba [13].

4.1.2. Límites. Norte: Provincia del Napo.

Sur: Provincia de Morona Santiago (teniendo como límite natural al río Pastaza)

Este: República de Perú

Oeste: Provincia de Tungurahua [13].

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

El ingreso desde la serranía por la ciudad de Baños por una carretera de primer Orden. Desde Baños la carretera en construcción hasta la parroquia Río Negro [13].

- El ingreso desde Macas cabecera cantonal de la Provincia de Morona Santiago se lo hace por una carretera de segundo orden [13].

- El ingreso desde Tena hasta el Puyo, se lo hace por una carretera de segundo orden atravesando los cantones de Carlos Julio Arosemena T. y Sta. Clara [13].

Distancias Terrestres hacia el centro de Operaciones:

- QUITO – PUYO 237 Km
- MACAS – PUYO 129 Km
- TENA-PUYO 79 Km
- AMBATO – PUYO 103 Km [13].

4.1.4. Sistema Hídrico del Río Bonanza. El Sistema hídrico del Río Bonanza se origina del límite occidental del bloque 23 al margen aluvial del Río Pastaza [14].

Este canal principal del río fluye de nor-oeste a sur-este a través de la parte norte y central del bloque.

El gradiente de este canal varía entre 0.07% y 0.3%. La descarga de este río se estima a 60m³/s. [14].

4.1.5. Condiciones Climáticas. Temperatura máxima 31.0° C y mínima 8.6° C, promedio de 20.3 ° C [13].

4.1.6. Precipitación. Precipitación y Humedad al Occidente y Cordillera Oriental 2000 mm. Y en la llanura Amazónica 4700 mm. Promedio anual 4538 mm [13].

La evapotranspiración potencial es menor que la precipitación, por lo cual no existe meses secos teniendo una humedad atmosférica promedio anual del 89% [13].

4.2. Protocolo de Trabajo.

4.2.1. Colecta de Muestras se realizo bajo el protocolo . ISO 10381-6:1993- Calidad de suelo. Muestreo. Parte 6: Líneas directrices para la recogida manipulación y almacenamiento de suelos destinados al estudios en laboratorios de procesos microbiológicos [14].

4.2.2 Metodología para identificación de bacterias aerobias, hongos, levaduras y bacterias degradadoras [15].

Se pesaron 15 g de suelo del área de estudio, Se añadió a un matraz Erlenmeyer de 250 ml, Se agregó 100 ml de medio Solanas (Solana, A.M.1985). tabla 1.

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

tabla 1: Medio Solana

Se agregó unas 5-10 gotas de tween 80 para facilitar la homogenización, Se incubo a 150 rpm durante 30 min. Se Tomo el sobrenadante y se realizo diluciones seriadas en solución salina hasta 10^{-8} (ISO 6887, 1993).

En estas diluciones se procedió a tomar el sobrenadante (solución madre) y de ahí se realizó 10^{-2} 10^{-4} (diluciones), De cada dilución se retiro 1ml por cada uno y se sembró en placas por duplicado en

medio de Agar Triptona soya para el conteo total de bacterias aerobias (ISO 4833:1991). tabla 2.

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

tabla 2: Agar triptona soya

Paralelamente las diluciones se sembraron en placas con Agar petróleo (Finnerty, 1983) para el conteo total de bacterias degradadoras de hidrocarburos. tabla 3

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

tabla 3: Agar petroleo

4.2.2 Realizar inoculaciones :

De la dilución 10^{-2} , 10^{-4} , se sumerjio con un hisopo de algodón estéril en la suspensión, removio el exceso de liquido del hisopo presionándola contra la pared del tubo [15]. Se preparo: 2.6 de agar malta en 80 ml de agua destilada + 4 g de cloruro de sodio al 5%. tabla 4.

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

tabla 4: Agar malta

Se realizaron inoculaciones en Agar Malta con un 5% de Cloruro de sodio para el conteo de hongos filamentosos y levaduras (ISO 7954: 1987). Empezando en la parte superior de la placa con agar malta y cloruro de sodio inocule la superficie con el hisopo frotando en todo la placa y rote la placa aproximadamente 60° y repita el procedimiento de frotado. Rote otra vez la placa. Esto garantizará que el inóculo sea distribuido homogéneamente [19]. Sugerencia técnica: Incube la placa dentro de los 15 minutos siguientes después de haber estandarizado el inóculo [19].



Figura: Inoculación de la placa [20].

4.2.3. Aislamiento de las bacterias degradadoras de hidrocarburos [21]. Las bacterias más representativas de la primera metodología fueron escogidas 2-3 placas en Agar petróleo.

Se sembró por agotamiento en medio Agar triptona soya. Se preparo el agar triptona soya en la cual se pesa 6.4 g de triptona de soya en 80 ml de agua destilada. Se procedio a depositar 20 ml en cada caja petri para luego ser llevado a incubación. Se incubo a 37 ° C por 24 h.

Para la caracterización cultural se observaron las bacterias al estereoscopio y para definir las características morfológicas tintoriales que se realizo con la tinción de Gram.

4.2.4 Caracterización de las cepas degradadoras.

Hidrocarburos Alifáticos: Para la determinación de la capacidad de utilización de fracciones de hidrocarburos alifáticos del petróleo como única fuente de carbono se añadió ,Se preparo 1% de queroseno densidad del compuesto Queroseno son de **0.8 g/mL** por lo tanto se toma 10 ml de querosene. Se tomó 10 ml de isoactano con un 10 ml de medio solanas todo esto por separado. El medio se inoculó con una asa de cultivo de cepa, Se incubo durante 21 días a 37 °C con indicador de crecimiento.

Hidrocarburos Aromáticos: Para la determinación de la capacidad de utilización de fracciones de hidrocarburos aromáticos, se utilizó 1% de Naftaleno (poliaromático) que es igual 1,28 gramos de naftaleno.

Disolvio el naftaleno como es insoluble en agua, se disolvió primero en acetona, 1 gramo de naftaleno por 50 ml de acetona. En este caso seria 64 ml de acetona. Se coloco al medio 10 ml de Tolueno (Aromático alquilado) en medio basal Solanas de 20 ml por separado. El Naftaleno, es un sólido insoluble en agua, se disolvió primero en acetona y luego se añadió al medio y se inoculó con un asa de cultivo de cepa. Incubar durante 21 días a 37 °C con indicador de crecimiento. Se identifico cepas degradadoras: A partir de cultivos frescos de las cepas que crecieron en todos los medios de aislamiento las cepas fueron cultivadas en medio TS(tripticaso soya) y de ahí se caracterizo e identifico atravez del Kit (API 20 NE, 2002) para la identificación de microorganismos Gram negativos no enterobacterias

5. Resultados y Recomendaciones.

- Esta técnica de biorremediación fue aplicada para disminuir la contaminación por los hidrocarburos de petróleo sus derivados y metales pesados.
- Se realizaron atravez de pruebas sucesivas de crecimiento poblacional en cultivos puros ricos en petróleo se aislo e identifico bacterias con capacidad para biodegradar fracciones de petróleo.
- Entre las bacterias más aisladas encontramos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia rubidae*, *Bacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Spirillum sp.*, *Xanthomonas.*, *Alcaligenes sp.*,
- Estas bacterias es una alternativa para neutralizar sustancias toxicas y transformándola en sustancias menos toxicas para el ambiente.

6. Conclusiones.

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



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA



posible la aplicación del proceso de Biorremediación por la técnica de la bioestimulación de los microorganismos autóctonos tal es el caso como los manglares.

- El potencial de los microorganismos para la biodegradación se puede obtener de una manera rápida para sólo ver si existen bacterias en un estado activo, o de una manera más a fondo para, además, determinar las condiciones óptimas de biorremediación y aproximar el tiempo requerido para sanear el sitio.

7. Bibliografía.

[1] ACOSTA, I; INFANTE, C. LOPEZ, W (1995). "Efecto de lodos petrolizados y lodos de tratamiento de aguas servidas sobre un suelo calciorthids de la península de Paraguay". *Agronomía Trop.* 45(4): 527-537.

[2] ÁLVAREZ JA, y col. (2004). "Aplicación de la Biorremediación para tratar los residuales sólidos petrolizados de fondos de tanques de la Refinería Níco López." P 2507, E03. CUPET. C. Habana, Cuba

[3]BIORREMEDIACION

Url: <http://www.familia.cl/naturaleza/biorremediacion/biorremediacion.htm>

Updated: 2006-10-20 02:00 - 1/1/1 - From:Yahoo - Rank:99%

[4] ASOCIACION COLOMBIANA DE INGENIERIA QUIMICA CAPITULO ATLANTICO

Url: <http://www.aciqca.org/>

Updated: 2011-02-13 03:00 - 1/1/1 - From:Yahoo - Rank:49%

[5] BIORREMEDIACION DE RESIDUOS DEL PETROLEO.

Url: <http://ciencias.uniandes.edu.co/pdf/petroleo.pdf>

Updated:2005-04-2702:00-1/9/1 - From:Yahoo - Rank:97%

[6] COSMOS Online® BACTERIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS

Url: <http://www.cosmos.com.mx/j/tec/dnlh.htm>

Updated: 2011-02-10 03:00 - 2/1/1 - From:Yahoo - Rank:99%

[7] Ron, E. Z. y Rosenberg, E (2002). Biosurfactants and Bioremediation. *Current opinion in biotechnology* 13: 249 – 252.

[8] ABOUT: HYDROCARBON

Url: <http://dbpedia.org/page/Hydrocarbon>

Updated: 2011-01-21 03:00 - 2/1/1 - From:Yahoo - Rank:99%

[9] DEGRADACION DE HIDROCARBUROS

Url: http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treball_s02O3/RBurgos/dades/degradaci%F3n_de_hidrocarburos.htm

Updated: 2003-06-05 02:00 - 2/1/1 - From:Yahoo - Rank:99%

[10] Medegan, MT (1998). Brock: Biología de los microorganismos 8va ed. Madrid, España

[11] Solana, A.M (1985). Biodegradación marina en la contaminación por hidrocarburos. *Mundo Científico.* 1(8): 913-920

[12] PROBLEMAS PETROLEROS

Url: <http://library.thinkquest.org/28368/espanol/petroleo.htm>

Updated: 2010-10-17 02:00 - 2/1/1 - From:Yahoo - Rank:99%

[13] PLAN VIAL DE LA PROVINCIA DE PASTAZA 2004

Url: http://www.pastaza.gov.ec/LEY%20DE%20TRANSPARENCIA_2010/PLANIFICACION/PLAN%20VIAL%20PARTICIPATIVO%20DE%20PASTAZA.pdf

Updated: 2010-01-27 03:00 - 1/1/1 - From:Yahoo - Rank:32%

[14] ISO 10381 - 6:1993, (1993). (E). International Standard. Guía para la colección, manejo y conservación del suelo para procesos microbianos aeróbicos en el laboratorio.

[15] (BERGEY'S (1974). Manual, the Systematic Bacteriology, Volumen I y II)

[16] ISO 6887:1993. (1993) (E). International Standard. Microbiology: General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination (1993).

[17] ISO 4833:1991(1991) (E). Microbiology-general guidance for the enumeration of microorganism colony count technique at 30 ° C.

[18] Finnerty, W. R., Schokley, K., and Attaway, H, (1983).Microbial desulphurization and denitrogenation of hydrocarbons. *Microbial Enhanced Oil Recovery.* Penn Well Books, Tulsa, Oklahoma: 83-91

[19] ISO 7954:1987 (1987) (E) Microbiología: Guía general para la enumeración de hongos y levaduras. Técnica del conteo de colonias a 25 oC.

[20] WWW.paho.org/spanish/ad/th/ev/04.pdf

[21] BERGEY'S (1984). Manual, the Systematic Bacteriology, Volumen I y II).