



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE INGIENIERIA MARITIMA Y CIENCIAS DEL MAR

PROYECTO DE MATERIA DE GRADUACION

**“APLICACIÓN DEL BIOFILM (*Burkholderia cepacia*) COMO
AGENTE BIORREMEDIADOR EN DERRAMES DE DERIVADOS
DE PETRÓLEO”**

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO

Presentada por:

Cruz Mera Christian Rubén

Proaño Constante Alberto Andrés

Guayaquil - Ecuador

2010

DEDICATORIA

A nuestros Padres por todo el sacrificio,

A la M.Sc Francisca Burgos y al Dr. Marcelo Muñoz

por todo el apoyo brindado en la elaboración de este proyecto y a

toda la Facultad de Marítima, la llevamos siempre en el corazón.

Declaración Expresa

“La responsabilidad del contenido de este Trabajo Final de Graduación nos corresponde exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”

Integrantes:

Christian Cruz M.

Alberto Proaño C.

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Conforman el Tribunal los siguientes miembros

Marcelo Muñoz Ph.D

Docente de la FIMCM

Francisca Burgos M.Sc

Directora de Tesis

INDICE GENERAL

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	1
MARCO TEORICO	4
2.1 Petróleo y su Composición	4
2.2 Contaminación por Derrames de Petróleo	5
2.3 Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	6
2.4 OBJETIVOS	8
2.4.1 Objetivo General:	8
2.4.2 Objetivos específicos:.....	8
2.5 Principales Impactos	9
2.5.1 Impactos Científicos.....	9
2.5.2 Impactos Sociales	9
2.5.3 Impactos Ambientales	9
2.6 RECURSOS Y METODOS	10
2.6.1 RECURSOS.....	10
2.6.1.1 Biológico.....	10
2.6.1.2 Instrumentos de laboratorio.....	10
2.6.1.3 Medio de Cultivo Solido.....	11
2.6.1.4 Sustratos para biofilm.....	11
2.6.1.5 Muestras para el análisis.....	12
2.6.1.6 Recursos Humanos.....	12
2.6.2 METODOS.....	12
2.6.2.1 Siembra y aislamiento.....	12
2.6.2.1.1 Siembra de Cepa Patrón.....	12
2.6.2.1.2 Aislamiento de la Colonia.....	13
2.6.2.2 Preparación de Biofilm.....	13
2.6.2.3 Conteo bacteriano.....	14
2.6.2.4 Tiempo de crecimiento logarítmico.....	14

2.6.2.5 ESTUDIO DE EFECTIVIDAD.....	15
2.6.2.5.1 Análisis del potencial de degradación.....	16
2.7 ANALISIS ESTADISTICO.....	17
2.8 Actividades: Tabla 1	17
2.9 Distribución del presupuesto: Tabla 2.....	18
2.10 Cronograma: Tabla 3.....	19
4.1 Resultados Esperados	20
4.2 Recomendaciones	20
CONCLUSIONES.....	21

Indice de Tablas:

Tabla 1: Actividades y costos.....	17
Tabla 2: Distribucion del presupuesto.....	18
Tabla3: Cronograma	19
Tabla 4: Costo de materiales.....	25

Indice de Figuras:

Figura 1: Corte transversal con sistema de aireacion.....	14
---	----

CAPITULO I:

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

El uso masivo del petróleo y sus derivados como principal fuente de energía a nivel mundial ha causado contaminación por hidrocarburos, de manera accidental en suelos, subsuelos, ríos y mares. [1].

La producción y extracción de petróleo en zonas costeras genera fugas o derrames crónicos de hidrocarburos. [1].

Datos revelan que hasta Septiembre del 2008, según Petroecuador, en el país se registraron 117 derrames de petróleo, lo que nos da a conocer que un incidente de este tipo se produjo cada dos días en promedio. [2].

Nuestro país por ser uno de los principales lugares de extracción de petróleo, está más propenso a la contaminación por derrames. Ante este hecho, es necesario desarrollar nuevas formas de manejo en el país para el tratamiento de ambientes contaminados por petróleo y sus derivados.

Sin embargo leyes y políticas de manejo de derrames no han sido establecidas. El Ministerio de Recursos no Renovables de la República del Ecuador en sus leyes del sector hidrocarburífero cita en solo un punto, en el

Art. 395 de la Constitución señala que el “Estado garantizará un modelo sustentable de desarrollo, ambientalmente equilibrado y respetuoso de la diversidad cultural, que conserve la biodiversidad, la capacidad de regeneración natural de los ecosistemas y asegure la satisfacción de las necesidades de las generaciones presentes y futuras” Artículo en el cual no se enfatiza la problemática actual de derrames, básicamente no existe un artículo o ley que regularice el manejo de los hidrocarburos.

Para este trabajo se propone el uso de una bacteria, llamada *Burkholderia cepacia*; la cual es un bacillo gran negativo, perteneciente a la familia Pseudomonadaceae, esta especie se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y ha sido aislada en el suelo, agua, plantas y verduras.[3].

Perteneciente a una familia cuyo historial en la biodegradación de hidrocarburos es muy grande, la *Burkholderia cepacia* es considerada como un agente de bioremediación. [4].

Debido a su versatilidad ecológica y a su gran capacidad de utilizar una gran variedad de compuestos como fuente de carbono (J. Parke *et al.* 2001), se consideró el uso de este microorganismo en los ensayos de biorremediación de derivados de petróleo.

Se conoce que ciertos microorganismos tienen la capacidad de crecer a partir de sustancias nocivas al medio ambiente de manera que la degradan hasta dióxido de carbono y agua [5-6-7], además, permiten tratar grandes volúmenes de contaminantes con un impacto ambiental mínimo, a diferencia de otros procedimientos de descontaminación [8].

Este trabajo se propone ampliar el conocimiento sobre el uso de la *B. cepacia* como un agente biorremediador en sistemas acuáticos contaminados con derivados de petróleo en este caso DIESEL, creando un sistema y metodología de uso de bacterias de fácil y rápido manejo ambiental.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1 Petróleo y su Composición

El petróleo es un líquido oleoso bituminoso de origen natural compuesto por diferentes sustancias orgánicas. Se encuentra en grandes cantidades bajo la superficie terrestre y se emplea como combustible materia prima para la industria química. El petróleo y sus derivados se emplean para fabricar medicinas, fertilizantes, productos alimenticios, objetos de plásticos, materiales de construcción, pinturas o textiles y para generar electricidad. [9].

En cuanto a su composición, se puede decir que está constituido por hidrocarburos varios, es decir compuestos ricos en carbono e hidrógeno, también contiene otros elementos minoritarios como azufre, oxígeno y nitrógeno, así como trazas de metales [10]. Estos compuestos de hidrógeno y carbono en su mayoría son parafinas, naftenos y aromáticos. [11].

2.2 Contaminación por Derrames de Petróleo

La industria petrolera en nuestro país es una de las bases fundamentales de la economía, sin embargo la explotación petrolera ha acarreado graves perjuicios ecológicos, sobre todo en la Amazonía.

Cabe recalcar que los derrames no solo causan impactos ambientales, sino también impactos sociales en los diferentes aspectos de vida de las personas que viven en zonas petroleras [12].

No obstante la falta de un programa de protección ambiental y políticas de manejo ambiental, hace que el medio ambiente se contamine y que grupos de personas que viven en estas zonas queden totalmente resignadas a de vivir en esta situación al producirse derrames de derivados sin ninguna ley que penalice esta acción [13].

Los dispersantes químicos usados para favorecer la remediación de los ambientes contaminados pueden causar mayor impacto ecológico, por su toxicidad y recalcitrancia a la biodegradación, por tanto una mejor alternativa de solución es el proceso de biorremediación [14].

A pesar de que los ambientes naturales cuentan con sistemas de biodegradación naturales, éstos pueden tardar mucho tiempo en lograrse, con el consecuente daño tanto para la flora y fauna local como para el ser humano. Por este motivo, en el caso de ambientes altamente

contaminados, es necesaria la acción del hombre para acelerar este proceso [15].

2.3 Complejo *Burkholderia cepacia*

El complejo *Burkholderia cepacia* es una colección de organismos genéticamente distintos pero similares fenotípicamente. Estas bacterias se dividen en al menos nueve especies. La *B. cepacia* se encuentran en todo el medio ambiente, donde pueden tener efectos beneficiosos y perjudiciales sobre las plantas y algunos miembros. También pueden degradar los contaminantes naturales y artificiales. Este complejo bacteriano ahora reconocido como un importante patógeno oportunista que puede causar infecciones variables de pulmón en pacientes con fibrosis quística. [16]

La *B. cepacia* es un grupo bacteriano Gram-negativo, que tiene un rol sumamente importante en la agricultura y en la industria biotecnológica. [16].

Productora de un pigmento amarillo tiene una gran capacidad mutagénica y adaptativa, ha sido recuperada a partir de agua y superficies húmedas, es resistente a múltiples antibióticos y ésta capacidad es altamente transmisible entre especies. [17].

Cabe recalcar que el género *Burkholderia* ha sido estudiado en la degradación de compuestos aromáticos teniendo buenos resultados [17].

Lo cual nos da como resultado un gran avance en nuestro proyecto y pone a esta bacteria como centro de atención en la biorremediación.

Este género es muy conocido en el ámbito clínico, por producir enfermedades, sin embargo es también muy conocido en el campo agrícola y biotecnológico por ser un gran agente biorremediador.

2.4 OBJETIVOS

2.4.1 Objetivo General:

- Utilizar el principio de biofilms a través del género (*Burkholderia cepacia*) como herramienta de manejo ambiental para tratar derrames de derivados de petróleo en un cuerpo de agua.

2.4.2 Objetivos específicos:

- Establecer las condiciones idóneas de laboratorio para la producción del Biofilm de (*Burkholderia cepacia*).
- Determinar la densidad óptima del inóculo necesario para la biorremediación de un cuerpo de agua dulce contaminado con Diesel.

2.5 Principales Impactos

2.5.1 Impactos Científicos

- Con la realización de este proyecto se creará una metodología adecuada para asignar un mejor uso de la bacteria *B. cepacia*, siendo esta reconocida como un agente infeccioso, queremos proponer el uso de la misma para controlar ambientes contaminados por derrames de derivados de petróleo y ofrecer esta metodología para nuevas investigaciones de uso de bacterias en la biodegradación de Hidrocarburos en diferentes ecosistemas

2.5.2 Impactos Sociales

- Evitar la expansión del impacto producido por derrames de derivados de petróleo cercano a los asentamientos humanos. Protegiendo de esta manera a las poblaciones de enfermedades producidas por la exposición a contaminantes.

2.5.3 Impactos Ambientales

- Con el uso de esta bacteria (*B. cepacia*), proponemos una alternativa sencilla, económicamente accesible y amigable con el ambiente en el control de la biorremediación de ecosistemas contaminados. Evitando de esta manera la destrucción de hábitats naturales.

2.6 RECURSOS Y METODOS

2.6.1 RECURSOS:

2.6.1.1 Biológico:

- Bacteria liofilizada ATCC® Number: 35130™ *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes) Yabuuchi et al. deposited as (Burkholder) Palleroni and Holmes SBDL-POPS-1.

2.6.1.2 Instrumentos de laboratorio

- Mecheros
- Vaso de precipitación
- Galón de H₂O destilada
- Galón de Alcohol
- Matraz Erlenmeyer 500 ml
- Pipeta 10 ml
- Placas
- Peceras de 10l de vidrio
- Aireadores
- Tubos de ensayo
- Estereoscopio
- Asas de platino
- Asas de vidrio

- Guantes
- Incubadora
- Espectrofotómetro
- Autoclave
- YFI (mide oxígeno, pH, temperatura)
- Balanza electrónica

2.6.1.3 Medio de Cultivo Solido

- Soya dextrosa tripticasa

2.6.1.4 Sustratos para biofilm

- KH_2PO_4 (Fosfato monopotásico)
- K_2HPO_4 (Fosfato ácido de potasio)
- NaNO_3 (Nitrato de Sodio)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de Magnesio Heptahidratado)
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Cloruro Férrico Hexahidratado)
- Biotina
- Riboflavina
- Niacina
- Acido Pantoténico
- Acido p-aminobenzóico
- Acido Fólico
- Tiamina
- Cianocobalamina

2.6.1.5 Muestras para el análisis

- Gas Oil- Diesel (PD)

2.6.1.6 Recursos Humanos:

- 3 laboratoristas

2.6.2 METODOS:

2.6.2.1 *Siembra y aislamiento*

2.6.2.1.1 Siembra de Cepa Patrón:

- Con un asa previamente esterilizada, se toma una muestra del cultivo de microorganismos y se extiende sobre un área pequeña de la superficie de la placa con medio de soya dextrosa tripticasa [18], en forma de estrías muy juntas, pero sin hacer presión para no dañar el agar.
- Se flamea el asa, se enfría y después de rozar la siembra realizada previamente, se extiende de nuevo por otra zona de la placa haciendo nuevas estrías. Este proceso se repite sucesivamente, flameando y enfriando el asa al comienzo de las sucesivas siembras en estría.
- Se lleva la placa a incubar, a una temperatura óptima de crecimiento a 22°C [18], siempre en posición invertida por 24 h a 48h.

2.6.2.1.2 Aislamiento de la Colonia:

- Tomar una colonia de la placa de la cepa patrón una vez incubada y sembrar en una segunda placa, en la que todas las colonias que crezcan deben ser idénticas.
- La inoculación primaria puede hacerse con un asa, hisopo u otro material sobre la superficie del medio agarizado en la placa petri o sobre caldos de cultivos.
- A partir de la segunda placa se puede re suspender una de las colonias en medio líquido, consiguiéndose ya un cultivo puro.

2.6.2.2 Preparación de Biofilm [19].

- Para esta preparación se utilizara 2 matraces Erlenmeyer con una capacidad de 500ml.
- Con el fin de mejorar la eficiencia en el proceso de crecimiento se adicionó un fertilizante compuesto por: KH_2PO_4 . 1.4 g; K_2HPO_4 . 1.7 g; NaNO_3 1.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.012 g; y 1 ml del compuesto formado por vitaminas como: Biotina 200mg; Riboflavina 50mg; Acido Nicotínico 50mg; Pantotenato 50mg; Acido p-aminobenzóico 50mg; Acido fólico 20mg; tiamina 15mg; Cianocobalamina 1,5mg todos estas disueltas en un litro de agua. [20]
- El aire se suministrará mediante un sistema de inyección en espiral de aire forzado, formado por una tubería plástica acoplada a un compresor que tiene como función bombear el aire.

- El sistema en espiral con espaciamiento calculado de 3cm cada punto de inyección de aire en el fondo, permitirá crear zonas alternas de transferencia y mezclado, evitando así la formación de volúmenes muertos (sin movimiento). Todos los orificios fueron colocados en el fondo ya que la profundidad mejora el tiempo de contacto.

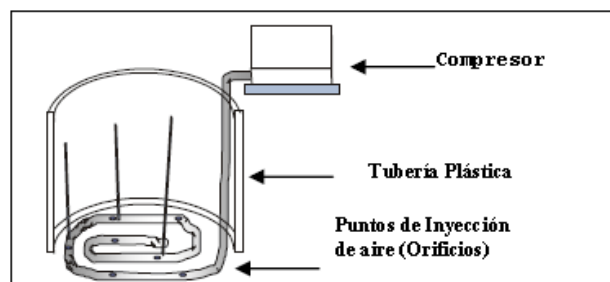


Figura 1. Corte transversal de un tanque con sistema de aireación. ARAUJO 2002. Biorremediación de aguas contaminadas con derivados de Hidrocarburos utilizando cepas bacterianas autóctonas.

2.6.2.3 Conteo bacteriano

- Se pipetea la muestra en una placa estéril
- Se añade medio estéril y se mezcla bien con el inóculo.
- Se deja encubar a 35°C por 24horas
- Se hace el conteo de colonias.

2.6.2.4 Tiempo de crecimiento logarítmico [21]

- Inocular en condiciones estériles un matraz Erlenmeyer de 500mL con 100mL de medio de cultivo complejo (Pascal 2003) con 10mL de un cultivo de *B. cepacia*

- Homogeneizar cuidadosamente agitando el matraz e inmediatamente tomar una muestra de 5mL con una pipeta estéril y vaciarla en una celda del espectrofotómetro.
- Determinar la turbidez de las muestras en un espectrofotómetro a 560nm.
- Esta muestra corresponderá al tiempo cero ($t=0$).
- De la misma manera se tomarán muestras a las 1, 2, 3, 4 y 5 horas.
- Para el tiempo de 6 horas de incubación se tomarán 6mL, además de evaluar la turbidez, se deberá poner 1mL del cultivo en un matraz Erlenmeyer con 99mL de solución salina isotónica (SSI) estéril.
- Del matraz con muestra diluida, hacer una serie de diluciones en tubos con 9mL de SSI estéril, hasta 108, cuidando de homogeneizar las muestras cada vez que se haga una nueva dilución.
- Enseguida inocular 0.1mL de las últimas tres diluciones en dos cajas de Petri con soya dextrosa tripticasa y distribuir la muestra con un asa de vidrio.
- Incubarlas en forma invertida durante 24-48 horas.
- Cuantificar el número de UFC/ml.

2.6.2.5 Estudio de efectividad [22]

2.6.2.5.1 Análisis del potencial de degradación

- En 1 pecera se coloca 5 ltrs. de agua destilada.

- Agregamos los 500ml del matraz de Erlenmeyer donde tenemos creciendo el biofilm.
- A continuación se pone 1 ltr.de PD.
- Se mantiene con aireación constante por 24, 48 y 72 horas.
- Luego se hacen los análisis correspondientes en cada intervalo de tiempo como son: Diesel e hidrocarburos totales por cromatografía, Contenidos de nitrógeno y fósforo total por espectrofotometría, Conteo de microorganismos.
- Y se realizará 2 peceras más de control.

2.6.2.5.2 Ensayo de concentración ideal

- Ponemos diferentes concentraciones de *B. cepacia* en 4 peceras con 7 litros de agua destilada sin ninguna fuente de alimento y con aireación constante y con diferentes concentraciones de bacteria a 10^7 , 10^9 , 10^{11} .
- Luego se le vierte 500ml de PD a cada una de las cuatro peceras.
- Se las mantiene con aireación por 48 horas.
- Luego se hace el análisis una vez más de diesel e hidrocarburos totales por cromatografía para obtener la tasa porcentual de efectividad.
- Y se van a realizar 3 controles con el mismo número de peceras 3 con las diferentes concentraciones de 10^7 , 10^9 , 10^{11} y una de control.

2.7 Análisis Estadístico:

Los resultados van a ser analizados a través de la varianza o del análisis de regresión, con unidades experimentales homogéneas y en condiciones ambientales controladas.

Se va a utilizar variables independientes, y un promedio para determinar una varianza poblacional.

2.8 Actividades y sus Costos: Tabla 1

N	Actividad	Fecha Inicio	Fecha Fin	Recursos Materiales	Recursos Humanos	Costo de la actividad
1	Búsqueda y Selección de Metodología	16/05/2010	11/06/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	\$ 744,19
2	Siembra y aislamiento	14/06/2010	17/06/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	\$ 617,71
3	Preparación de Biofilm	18/06/2010	21/06/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	\$2.074,75
4	Conteo bacteriano	21/06/2010	22/06/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	\$1.801,05
5	Tiempo de crecimiento logarítmico	23/06/2010	25/06/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	\$ 2854,05
6	Estudio de efectividad	28/06/2010	15/07/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	\$3.212,21
7	Realización del informe	19/07/2010	23/09/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	\$389,69
COSTO TOTAL PROYECTO						\$11.693,7

2.9 Distribución del presupuesto: Tabla 2

	Aporte CICYT (US\$)	Otros Aportes Institucionales (US\$)	Aporte Externo(US\$)	Total (US\$)
1 Viajes Técnicos				
2 Capacitación (<i>pasantías, cursos</i>)				
3 Equipos ($\leq 50\%$)		9857,7	86	9943,70
4 Libros y Revistas			288	288
5 Materiales y Suministros			1372	1372
6 Transferencia de resultados				
7 Subcontratos y servicios ($\leq 20\%$)			90	90
Total		9857,7	2438,82	11693,7
Porcentaje		78,793%	21,207%	100

En esta distribución ponemos como base que el CICYT no financiará el proyecto, por lo que los gastos netamente correrán por parte de los alumnos.

2.10 Cronograma: Tabla 3

ACTIVIDADES	MESES	1				2				3				4				5				6			
	SEMANAS	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
	Búsqueda y Selección de bibliografía	X	X	X	X																				
Selección de Metodología	X	X	X	X																					
Estudios de materia prima para sustrato ideal				X	X	X	X	X																	
Pruebas de biorremediación en acuarios									X	X	X	X													
Análisis de Datos.									X	X	X	X	X	X	X	X									
Redacción de la Tesis																	X	X	X	X	X	X	X	X	
Realización de tesis en borrador	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	

En la siguiente tabla, se explica la rutina que se deberá llevar a cabo. Para la realización de este tema. Hemos dado a notar, que la realización del borrador se deberá realizar desde el primer mes hasta el último, con el ánimo de poder mantener actualizada cada información.

CAPITULO III

4.1 Resultados Esperados

1. Esperamos que el crecimiento logarítmico de la bacteria sea rápido con lo que, la actividad biorremediadora del biofilm sobre el cuerpo de agua contaminado con diesel sea en menor tiempo posible.
2. La efectividad biorremediadora esperada del biofilm de *B. cepacia* sobre el diesel en el cuerpo de agua dulce sea sobre el 75%.
3. Se espera encontrar la densidad del inóculo adecuada, para que la biorremediación del cuerpo de agua contaminado sea rápida y eficaz en el menor tiempo posible.

4.2 Recomendaciones

1. Se recomienda que se deberá instruir previamente para el manejo adecuado de la bacteria para que su uso en laboratorio sea aséptico.
2. Para que el crecimiento de la bacteria en el biofilm sea óptima sin estrés, se deberá medir los parámetros físicos cada 6 horas.
3. Las cantidades de nutrientes que se utilizarán deberán ser exactos para que la biodegradación sea efectiva.

CONCLUSIONES

1. Será de de mayor ayuda lograr encontrar mejores precios para los equipos de análisis, o en mejor instancia lograr hacer los análisis en un laboratorio especializado ya que el costo total del proyecto es alto debido a los equipos de análisis.
2. Dentro del la familia Pseudomonadaceae el género *B. cepacia*, es el más indicado para este tipo de estudios, debido a su gran acción biorremediadora y también a que tiene un nivel de bioseguridad tipo 2.
3. Al utilizar nutrientes en el medio líquido, se logra que el crecimiento de la bacteria en el biofilm sea de una manera rápida, con ello obtenemos un densidad poblacional óptima para que la biorremediación sea eficaz.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nievas M. Esteves J. Informe técnico: relevamiento de actividades relacionadas con la explotación de petróleo en zona costera patagónica y datos preliminares sobre residuos de hidrocarburos en puertos. Cenpat - centro nacional patagónico. 2007
2. Guaranda X. INREDH. Acciones judiciales por derrames de petróleo. 2006.
3. Frías J. Burkholderia cepacia (b. Cepacia). Nuevo patógeno de infecciones nosocomiales. Serie de casos clínicos. 2008
4. Coenye T., Vandamme P., Lipuma J., Govan J., Mahenthiralingam E. Updated version of the Burkholderia cepacia complex experimental strain panel. 2003.
5. Advanced BioTech, "Why add microbes?" Advanced BioTech, California, USA. http://www.adbio.com/bioremed/why_add_microbes.htm 2000.
6. Mac Kay, N.I. Biorremediación. <http://www.ambienteNews.htm>. 2001. 1-4.
7. Shmaefsky, B.R. Bioremediation: Panacea or fad? Access Excellence. The National Health Museum. <http://www.accessexcellence.org/LC/ST/st3bg.html>. . 1999.

8. Molnaa, B.A y Grubbs, R.B. Bioremediation of petroleum contaminated soil using microbial consortia as inoculum. <http://www.bugsatwork.com/default.htm>. 2001
9. <http://www.elpetroleo.50webs.com/elpetroleo.htm>_ 12 de Mayo del 2010.
10. Valderrama B., Téllez J. Microbiología del petróleo y sus derivados Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. AP 510-3, Cuernavaca, Mor. 62250 México
11. Leffler M. Composición Química y propiedades del Petróleo. 2006.
12. Bustamante T., Jarrin Cristina. Impactos sociales de la actividad petrolera en Ecuador: un análisis de los indicadores. 2004.
13. Grefa B. Presidenta de FCKUNAE [.http://indigenouspeoplesissues.com](http://indigenouspeoplesissues.com). Video sobre los impactos de los derrames en la Amazonia ecuatoriana. 2010.
14. Inga R. Carreño C. Biodegradación de petróleo diesel. 2009.
15. Raiger I., Laura J., López N. Los biosurfactantes y la industria petrolera. Laboratorio de biotecnología ambiental y ecología bacteriana, departamento de química biológica, Buenos Aires-Argentina. 2009
16. Baldwin A., Mahenthiralingam E., Drevinek P., Vandamme P., Govan J., Waine D. LiPuma J., Chiarini L., Dalmastrì C., Henry D., David P. Honeybourne D., Maiden M., Dowson C. Environmental Burkholderia cepacia Complex Isolates in Human Infections. United Kingdom. 2007

17. Benavides J., Quintero G., Guevara A., Jaimes D., Gutiérrez S., Miranda J. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados de petróleo. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. 2006.
18. ATCC. Number 35130™ *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes) Yabuuchi et al. deposited as *Pseudomonas cepacia* (Burkholder) Palleroni and Holmes, oil, Tabasco, Mexico. 2010
19. Araujo Vílchez. Biorremediación de aguas contaminadas con derivados de hidrocarburos utilizando cepas bacterianas autóctonas. Congreso interamericano de ingeniería sanitaria y ambiental Cancún, México, 27 al 31 de octubre, 2002. Pag. 3,4
20. Pascal (rueil malmaison, fr), Fayolle, Françoise (clamart, fr), Monot, Frédéric. Process for producing *Burkholderia cepacia* in the presence of tert-butanol or tert-amyl alcohol, the inoculum produced, and a process for degrading said alcohols, united states patent 6632649, (nanterre, fr), 2003. <http://www.freepatentsonline.com/6632649.html>
21. Aquihuatl M. Manual de prácticas de laboratorio de microbiología general. 2002. pdf
22. Aycachi Inga. Biodegradación de petróleo diesel. Universidad nacional Pedro Ruiz Gallo Lambayeque. 2008

ANEXOS

Tabla 4: Costos de materiales, medios, reactivos, equipos, recursos bibliográficos y análisis a utilizar en nuestro proyecto

Materiales Laboratorio	Precios Unitario	Cantidad	Total \$
Mecheros	\$ 7,92	4	\$ 31,68
Vaso de precipitación	\$ 12,00	5	\$ 60,00
Galón de H2O destilada	\$ 1,55	4	\$ 6,20
Galón de Alcohol	\$ 6,00	4	\$ 24,00
Matraz erlenmeyer 500 ml	\$ 13,00	4	\$ 52,00
Pipeta 10 ml	\$ 3,50	5	\$ 17,50
Placas	\$ 2,87	6	\$ 17,22
Peceras de 10l de vidrio	\$ 50,00	19	\$ 950,00
Aireadores	\$ 12,00	10	\$ 120,00
Tubos de ensayo	\$ 0,25	6	\$ 1,50
Estereoscopio	\$ 350,00	1	\$ 350,00
Asas de platino	\$ 16,32	5	\$ 81,60
Asas de vidrio	\$ 4,00	5	\$ 20,00
Guantes	\$ 4,00	5	\$ 20,00
Incubadora	\$ 1.200,00	1	\$ 1.200,00
Espectrofotómetro	\$ 3.600,00	1	\$ 3.600,00
Autoclave	\$ 342,00	1	\$ 342,00
YFI (mide oxígeno, pH, temperatura)	\$ 3.000,00	1	\$ 3.000,00
Balanza electrónica	\$ 50,00	1	\$ 50,00
		Subtotal	\$ 9943,70

Medio de Cultivo Solido	Cantidad	Precio
Soya dextrosa tripticasa	500g	320
	Subtotal	320

Sustratos para biofilm		
Nomenclatura	cantidad	Precio
KH ₂ PO ₄ (Fosfato monopotásico)	1 kg	\$ 45,00
K ₂ HPO ₄ (Fosfato ácido de potasio)	1 kg	\$ 70,00
NaNO ₃ (Nitrato de Sodio)	500 g	\$ 63,00
MgSO ₄ 7H ₂ O (Sulfato de Magnesio Heptahidratado)	500 g	\$ 48,00
FeCl ₃ 6H ₂ O (Cloruro Férrico Hexahidratado)	1 kg	\$ 42,00
	Subtotal	\$ 268,00

Vitaminas	Cantidad	Vitamina	Precio
Biotina	30 capsulas	B7-H-B8	15
Riboflavina	30 capsulas	B2	
Niacina	30 capsulas	B3	15
Acido Pantoténico	30 capsulas	B5	
Acido p-aminobenzóico	30 capsulas	ácido 4-aminobenzóico	15
Acido Fólico	30 capsulas	B9- M	
Tiamina	30 capsulas	B1	15
Ciancobalamina	30 capsulas	B12	15
		Subtotal	\$ 75,00

Derivado a utilizar	Precio unitario	cantidad	Precio
Gas Oil- Diesel	1,12	1 galón	\$ 1,12
		Subtotal	\$ 1,12

Análisis	Precio
Fenoles	40
Hidrocarburos y Petróleo totales	50
Subtotal	90

Recursos Bibliográficos	Precio
Biología de microorganismos de Brocks	132
Internet	156
Computadora	659
Tinta	49

COSTO TOTAL	\$ 11.693,7
--------------------	--------------------