



**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PANAMA**  
**FACULTAD DE INGENIERIA CIVIL**  
**DOCTORADO EN INGENIERIA DE PROYECTO**

**TESIS DOCTORAL**

**Modelo para determinar el potencial de depuración de microorganismos en degradar hidrocarburos, para la aplicación a sistemas de tratamiento biológico en Zonas Portuarias: Caso de Estudio, Bahía de Manzanillo.**

**ARIEL ANTONIO GREY GARIBALDI**

**ASESORA**

**DRA. VICCELDA DOMINGUEZ DE FRANCO**

**Febrero, 2015**

## **Resumen**

**Proyecto: Modelo para determinar el potencial de depuración de microorganismos en degradar hidrocarburos, para la aplicación a sistemas de tratamiento biológico en Zonas Portuarias: Caso de Estudio, Bahía de Manzanillo.**

**Profesora Asesora: Dra. Viccelda Domínguez de Franco**

**Estudiante: Ariel Antonio Grey Garibaldi**

La calidad del agua en cada una de las áreas de la Bahía no evidencia graves problemas de contaminación, tanto a nivel de línea costera como en la parte externa de la misma, probablemente por la dinámica de las corrientes y por el poder de dilución y depuración del agua de mar; no obstante, se debe considerar que con el tiempo, y existiendo descargas residuales puntuales y permanentes, en un futuro se podría provocar contaminación. Las variaciones de todos los parámetros, con excepción de la turbiedad, es aproximadamente de 2 unidades, lo cual es bajo. En el caso de la turbiedad la variación es mayor de 2 a 3 veces más que el resto de los parámetros y se da de forma más uniforme, lo que favorece la mejor correlación con el CIAM. Por lo cual se puede concluir que el CIAM es un buen representador de la calidad del agua, al observar que se mantienen los comportamientos ya estudiados de calidad de agua. El análisis de los resultados sugiere que algunas zonas tales como las adyacentes a las estaciones de muestreos 2 y 3 no son aguas aptas para contacto directo. Es decir, deberán existir restricciones para el desarrollo de actividades de deportes acuáticos, balnearios, y el turismo en general que requiera contacto directo con las aguas marinas y costeras, lo cual limita las posibilidades de desarrollo económico de estas zonas por la vía del turismo.

La textura y las fracciones más representativas de los sedimentos fueron el limo (entre 83,00 y 90,00%), y la arcilla entre 16,00 a 20,00%; y la arena arrojó un 0,00% en la zona. Sin embargo, en la estación 3, la fracción textural con mayor porcentaje fue la de limo (90,00%), seguida de arcilla (10,00%) y arena (0,00%).

Cabe destacar que el sedimento predominante en la zona costera es de granos delgados. Cabe señalar que predominan sedimentos limo arcilloso y solo cerca de la zona influenciada por el Río Folks predomina el Limo dónde se encontraron los valores más altos que corresponde a ambos periodos tanto lluvioso como seco. Las tendencias observadas tanto en tamaño de sedimento y el contenido de materia orgánica sugieren un ambiente muy favorable para la afinidad de los compuesto orgánicos como los HAP, a la fracción sólida de la Bahía de Manzanillo; por otra parte, tanto la temperatura ( $\pm 23$  °C), como el pH neutro ( $\pm 7$ ), son favorables tanto para la actividad de tolerancia de algunas bacterias y el consumo de hidrocarburos para otras.

En todas las muestras analizadas, solo en la que corresponde al E3 que está influenciado a el aporte de la aguas proveniente del Río Folks se encontró en una concentración aproximada a 73 mg/L el compuesta fenantreno. En el caso de la E1 se encontró una concentración de 66 mg/L de naftaleno. El origen de este compuesto en los sedimentos de la Bahía de Manzanillo es primordialmente debido a derrames puntuales y accidentales de algunas sustancias que por escorrentías llegan al fondo arrastrado por el Río Folks. En el sedimento de la Bahía de Manzanillo se encontró que las cepas *Rhodococcus equi* y *Corynebacterium propingun*, cuentan con la capacidad de degradar naftaleno como única fuente de carbono. Para el caso del fenantreno y pireno, no se evidenció crecimiento. Es importante resaltar que no se han encontrado otros estudios en los cuales el *Rhodococcus equi*, se halla utilizado como agente biodegradador de algún compuesto orgánico recalcitrante. El *Rhodococcus equi* fue la cepa que se encontró con mayor abundancia, en relación a la *Corynebacterium propingun* (3:2).

De los seis (6) bioensayos de crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi* utilizando como única fuente de carbono naftaleno, se presentaron los dos comportamientos de crecimiento y los dos modelos cinéticos de crecimiento más representativos (septiembre 2012 y julio 2013); obteniendo  $K_s$  de 458 mg/L a la  $T^\circ$  de 30°C y  $K_s$  de

403 mg/L a la T° de 26°C, esto sustenta lo encontrado por Bitton (1994); Huertas (2010); Lara (2011), que a mayores temperaturas mayor es la capacidad de un organismo de consumir un sustrato. Se logró comprobar la sensibilidad de la cepa *Rhodococcus equi* a los cambios de temperatura, pH, salinidad y velocidad de agitación. Y también su capacidad de degradar naftaleno; y además, materia orgánica (DBO5 y DQO5) en un reactor en continuo a escala de laboratorio.

De los cinco (5) bioensayos de crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi* utilizando como única fuente de carbono naftaleno, se presentaron los dos comportamientos de crecimiento y los tres modelos cinéticos de crecimiento más representativos (escenario 1, 2 y 3) y de acuerdo a la Figura 5.7 debido a que se manejaron concentraciones muy bajas no se halló la  $\mu_{max}$ ,  $\mu_{max} / 2$  y  $K_s$  (constante de saturación), para las estaciones presentadas. Sin embargo, esto se debe a que en sistemas, como plantas de tratamiento, las cargas con que se trabajan son muy bajas (Chang *et al.*, 2014) en relación con las que se analizaron en el Capítulo 4, donde se buscaron constantes de inhibición y hasta los 2000 mg/L, no se encontraron. En función de la pendiente, cabe señalar que el mejor escenario fue el número 3 donde se encontraban los rangos adecuados para el crecimiento bacteriano.

La eficiencia de degradación de la cepa *Rhodococcus equi* en un reactor en continuo, a escala de laboratorio, se comprobó a través de dos escenarios, el primero con un tiempo de retención de 24 horas y el segundo con un tiempo de retención hidráulico de 48 horas. Se pudo comprobar la eficiencia de degradación de naftaleno de la cepa *Rhodococcus equi*, a la salida del reactor en relación con la entrada al mismo, logrando el 100 % de consumo del hidrocarburo, la máxima eficiencia de degradación en DQO fue 36,44% y en DBO fue 66,19%, esto se da cuando el tiempo de retención hidráulica en el reactor es mayor, como fue el caso de escenario 2, donde el tiempo de retención hidráulica (TRH) fue de 48 horas. Mientras que los porcentajes de eficiencias en el escenario 1 fueron menores en comparación con el escenario 2. De esta manera se comprueba que al aumentar

el tiempo de retención hidráulico, aumenta la eficiencia de la cepa de realizar su trabajo de degradación en el reactor.

Las recomendaciones están basadas en establecer un el Sistema Integrado de control de calidad de las aguas en el sector marítimo- portuarios de la Bahía de Manzanillo, resultando una herramienta de gran ayuda en la toma de decisiones y en gestión del entorno marítimo-portuario al permitir entre otras, poner en marcha actuaciones de emergencia y las correspondientes los Planes de Contingencia, como también, establecer políticas de monitoreo de HAP en agua, sedimentos y en efluentes como una metodología adecuada para el aseguramiento de la calidad del entorno y así establecer parámetros de control y normativas de seguimientos en las zonas costeras. Analizar las cinéticas de biodegradación de naftaleno a concentraciones mayores a 2000 mg/L con la finalidad de encontrar la constante de inhibición; además, realizar bioensayos con diferentes combinaciones de hidrocarburos. Realizar otros estudios en los cuales se ensaye la eficiencia de degradación de la Cepa, en función de cambios en los parámetros de diseño del reactor en continuo. Por último se deben comparar las cinéticas de cepas aisladas versus cinéticas en consorcio.

## **Dedicatoria**

Dedico este proyecto a Dios, quien supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaron y enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mi familia, en especial a mi madre y mi esposa, por su apoyo incondicional, consejos y ayuda. Y a mis hijos, por estar siempre presente acompañándome para poder culminar esta meta lograda.

A mis amistades, quienes estuvieron presente durante la realización de esta investigación y toda mi carrera universitaria. Gracias por los consejos y ánimos en los momentos difíciles.

A mis profesores, amigos y colegas, gracias por su tiempo, por su apoyo así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de esta investigación. Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este proyecto.

**Ariel Antonio Grey Garibaldi**

## **Agradecimiento**

Agradecerles en primer lugar a Dios y a la Dra. Viccelda Domínguez de Franco, que como asesora me brindo su apoyo, dedicación y tiempo para desarrollar la presente investigación; que con gran paciencia y toda la disposición nos compartió sus conocimientos, enseñanzas y experiencias permitiéndonos crecer tanto personal como académicamente.

A los Doctores y Coasesores María Lourdes Peralta, Martin Edmundo Candanedo, Cecilia Guerra y Ramfis Miguelena, por el apoyo, orientación, y enseñanza durante la realización de este trabajo.

A los profesores Cenobio Ernesto Cárdenas, Fermín Mejía, Albano Díaz y Noriel Franco por su incondicional apoyo y ayuda. Fue de vital importancia sus aportes en la culminación de este proyecto.

A la Universidad Tecnológica de Panamá, a la Facultad de Ingeniería Civil, al laboratorio de Sanitaria de la Universidad Tecnológica de Panamá (UTP), al Centro Experimental de Ingeniería, Laboratorio de Microbiología Aplicada (UP), al Ministerio de Desarrollo Agropecuario, al laboratorio Inspectorage, Servicio Aereanaval, Autoridad Marítima de Panamá sobre todo a la Secretaria Nacional de Ciencias, Tecnología e innovación (SENACYT), por acogernos y el apoyo brindado en la ejecución de la investigación. En especial a Yarisel González y José Luis Chávez, por su amabilidad y colaboración de buena voluntad en la realización de este estudio. Un agradecimiento especial a las estudiante Rita Huertas, Corro, Lourdes Arenas, Aminta Pérez por su valioso aporte en esta investigación.

A todos nuestros profesores, amigos y colegas que a lo largo de estos años compartieron su valiosa experiencia y forman parte importante de los logros alcanzados hasta el momento.

A nuestros padres y familiares, por su apoyo incondicional y sus palabras de ánimo, a amigos y compañeros por estar presentes y atentos de nuestro avance en esta investigación.

**Ariel Antonio Grey Garibaldi**

<b>Índice General</b>	
<b>Resumen</b>	<b>ii</b>
<b>Agradecimiento</b>	<b>Vi</b>
<b>Dedicatoria</b>	<b>Vii</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>Xiv</b>
<b>Índice de Tablas</b>	<b>Xix</b>
<b>Índice de Anexos</b>	<b>Xxiv</b>
<b>Introducción</b>	<b>Xxii</b>

	<b>Número página</b>
<b>Capítulo I</b>	
<b>1. Marco conceptual</b>	<b>2</b>
1.1. Antecedentes	<b>5</b>
1.2. Justificación	<b>9</b>
1.3. Objetivos	<b>13</b>
1.3.1. Objetivo General	<b>13</b>
1.3.2. Objetivos Específicos	<b>13</b>
1.4. Hipótesis	<b>14</b>
1.5. Alcance y beneficios de la investigación	<b>14</b>
1.6. Referencias bibliográficas	<b>16</b>
 <b>Capítulo II</b>	
<b>2. Caracterización del agua marina y costero de la Bahía de Manzanillo</b>	<b>24</b>
2.1. Introducción	<b>24</b>
2.1.1. Generalidades del agua marino costera	<b>24</b>
2.1.1.1. Contaminación del agua marino costera	<b>24</b>
2.1.1.2. Calidad del agua marino costero	<b>25</b>
2.1.2. Análisis del agua marina costera	<b>27</b>
2.1.2.1. Parámetros físicos	<b>27</b>
2.1.2.2. Parámetros químicos	<b>28</b>
2.1.2.3. Parámetros microbiológicos	<b>30</b>

2.2.	Objetivos	31
2.3.	Métodos y materiales	31
2.3.1.	Diseño experimental	31
2.3.2.	Toma de muestras	33
2.3.3.	Ensayos	35
2.4.	Resultados y discusión	35
2.4.1.	Calidad física	42
2.4.2.	Calidad química	47
2.4.3.	Calidad microbiológica	51
2.4.3.1.	Índice de Calidad Fisicoquímico y Microbiológicos del agua marina (CIAM)	54
2.4.4.	Pronóstico de la calidad integral del agua Marina	57
2.5.	Conclusiones y Recomendaciones	60
2.6.	Referencias bibliográficas	62

### Capítulo III

<b>3.</b>	<b><i>Caracterización y Análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en sedimentos de la Bahía de Manzanillo</i></b>	<b>70</b>
3.1.	Introducción	70
3.1.1.	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)	70
3.1.1.1.	Hidrocarburos en sedimentos	71
3.1.2.	Propiedades Físico y Químicas	72
3.1.2.1.	Naftaleno	73
3.1.2.2.	Fenantreno	74
3.1.2.3.	Pireno	75
3.2.	Objetivos	76
3.3.	Materiales y métodos	76
3.3.1.	Análisis del muestra	76
3.3.1.1.	Textura	76

3.3.1.2.	Contenido de Materia Orgánica	78
3.3.1.3.	Extracción de los HAP	80
3.3.1.4.	Caracterización y cuantificación de los HAP	83
3.3.1.5.	Determinación de pH	87
3.4.	Resultado y Discusión	89
3.5.	Conclusiones y Recomendaciones	101
3.6.	Referencias Bibliográficas	102

#### **Capítulo IV**

<b>4.</b>	<b><i>Aislamiento e Identificación de Microorganismos con capacidad de tolerar y/o degradar Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en sedimento de la Bahía de Manzanillo.</i></b>	<b>114</b>
4.1.	Introducción	114
4.1.1.	Biodegradación de los HAP	114
4.1.1.1.	Microorganismos degradadores de HAP	114
4.1.1.2.	Factores que influyen en la degradación microbiana de los hidrocarburos	120
4.1.2.	Modelos de biodegradación	123
4.1.2.1.	Cinético de Crecimiento y Biodegradación	124
4.2.	Objetivos	127
4.3.	Métodos y materiales	127
4.3.1.	Diseño experimental	127
4.3.2.	Reactivos y Disolventes	128
4.3.3.	Medio de cultivos	128
4.3.4.	Cultivo de los microorganismos sobre medio enriquecido	129
4.3.5.	Método de enriquecimiento	130
4.3.6.	Inóculo	130

4.3.7. Aislamiento de cepas degradadoras de Hidrocarburos	131
4.3.8. Identificación de cepas degradadoras de Hidrocarburos	131
4.3.8.1. Ensayo de enriquecimiento y crecimiento del naftaleno	131
4.3.8.2. Método directo de conteo de colonias por gotas	132
4.3.8.3. <i>Rhodococcus equi</i> en medio líquido: Curva de calibración	133
4.4. Resultado y Discusión	134
4.5. Conclusiones y Recomendaciones	142
4.6. Referencia Bibliografía	143
<b>Capitulo V</b>	
<b>5. Análisis de sensibilización de biodegradación y su aplicación en Reactores para la biorremediación en agua y sedimentos contaminados por hidrocarburos.</b>	<b>150</b>
5.1. Introducción	151
5.1.1. Variables que influyen en la biodegradación	152
5.1.2. Analisis de Sensibilidad	154
5.2. <i>Objetivos</i>	155
5.3. Materias y Métodos	155
5.3.1. Crecimiento bacteriano con variación de temperatura.	156
5.3.2. Crecimiento bacteriano con variación de pH	156
5.3.3. Crecimiento bacteriano con variación de la salinidad.	157
5.3.4. Efecto de la agitación sobre el crecimiento bacteriano	157

5.3.5. Simulación de la Biorremediación mediante la aplicación de un Bioreactor en continuo	158
5.4. Resultados y discusión	160
5.4.1. Análisis de sensibilidad	160
5.4.2. Simulación de degradación en un Reactor en Continuo	172
5.5. Conclusión y Recomendaciones	176
5.6. Referencia bibliográfica	179
Anexos	185

## Índice de Figuras

<b>Figura</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Figura 1.1	Mapa de la Zona de Estudio	10
Figura 2.1	a) Mapa de Panamá, ubicación de la Provincia de Colón; b) Ubicación de los puntos de muestreo en la Bahía de Manzanillo Colón.	32
Figura 2.2	Recorrido en toma de muestra en suelo y sedimento	34
Figura 2.3	Modelo de Distribución de puntos de muestreos	35
Figura 2.4	Potencial de Hidrogeno en la Bahía de Manzanillo desde enero 2011 a febrero 2013. (--- media de los valores de pH)	42
Figura 2.5	Turbiedad en la Bahía de Manzanillo desde enero 2011 a febrero 2013. (--- media de los valores de turbiedad)	44
Figura 2.6	Temperatura en la Bahía de Manzanillo desde enero 2011 a febrero 2013. (--- media de los valores de Temperatura °C)	45
Figura 2.7	Sólidos totales en la Bahía de Manzanillo desde enero 2011 a febrero 2013. (--- media de los valores de Sólidos Totales)	46
Figura 2.8	Oxígeno Disuelto en la Bahía de Manzanillo desde enero 2011 a febrero 2013. (--- media de los valores de oxígeno disuelto)	47
Figura 2.9	Demanda Bioquímica de Oxígeno en la Bahía de Manzanillo desde enero 2011 a febrero 2013. (--- media de los valores de DBO <sub>5</sub> )	49
Figura 2.10	Distribución superficial de los parámetros físico químicos en la Bahía de Manzanillo (a. pH, b. turbiedad, c. temperatura, d. salinidad, e. oxígeno disuelto y f. DBO)	51
Figura 2.11	Coliformes Totales en la Bahía de Manzanillo desde enero 2011 a febrero 2013. (--- media de los valores de coliformes totales)	52
Figura 2.12	<i>Echerichia coli</i> en la Bahía de Manzanillo desde	53

	enero 2011 a febrero 2013. (--- media de los valores de <i>Escherichia coli</i> )	
Figura 2.13	Correlaciones del CIAM en dependencia (a) Coliformes totales (b) <i>Escherichia coli</i> en la Bahía de Manzanillo	58
Figura 2.14	Correlaciones del CIAM en dependencia (c) demanda bioquímica de oxígeno, (b) oxígeno disuelto en la Bahía de Manzanillo.	59
Figura 2.15	Correlaciones del Índice de Calidad de Agua Marina en relación al pH en la Bahía de Manzanillo	59
Figura 2.16	Correlaciones del Índice de calidad de agua marina en analogía a la (a) turbiedad (b) temperatura en la Bahía de Manzanillo	60
Figura 3.1	Estructura molecular del naftaleno	73
Figura 3.2	Estructura molecular del fenantreno	74
Figura 3.3	Estructura molecular del pireno.	75
Figura 3.4	Triangulo de Sheppard	77
Figura 3.5	Sistema de Extracción Soxhlet	82
Figura 3.6	Rotavapor o Concentrador	83
Figura 3.7	Equipo Perkin Elmer Arnel	84
Figura 3.8	Curva patrón del Naftaleno (a), Fenantreno, (b) y Pireno, (c)	85
Figura 3.9	Cromatograma patrón del los patrones naftaleno (a), fenantreno (b), pireno (c) y el blanco (d) obtenido durante la optimización de las condiciones cromatografía.	88
Figura 3.10	Distribución textural de los sedimentos costero de la Bahía de Manzanillo	89
Figura 3.11	Distribución espacial de los sedimentos en la Bahía de Manzanillo. (----) Limo arcillosos y (----) Limo.	90
Figura 3.12	Cromatograma de la estación 3	98
Figura 3.13	Cromatograma de la E1, Naftaleno (a) y Fenantreno (b).	99
Figura 4.1	Procesos principales en la degradación de hidrocarburo por microorganismo	122
Figura 4.2	Evolución de la velocidad especifica del	126

	crecimiento en función de la concentración del sustrato	
Figura 4.3	Metodología utilizada para el aislamiento de cepas de bacterias capaces de degradar los hidrocarburos aromáticos policíclicos	128
Figura 4.4	Curva de calibración de <i>Rhodococcus equi</i> en relación UFC/ml y Turbidez (Abs)	133
Figura 4.5	Bacterias identificadas por medio API Coryne a) <i>Rhodococcus equi</i> , b) <i>Corynebacterium propinquum</i>	136
Figura 4.6	Curva de tolerancia de los microorganismos estudiados <i>Rhodococcus equi</i> y <i>Corynebacterium propingun</i>	137
Figura 4.7	Curva de tolerancia en medio líquido del consorcio bacteriano. La curva manifiesta los sustratos Pireno, Naftaleno y Fenantreno	138
Figura 4.8	Curva de crecimiento en medio líquido del <i>Rhodococcus equi</i> . La curva manifiesta las concentraciones de naftaleno, 125 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L, 750 mg/L, 1000 mg/L y 2000 mg/L. Septiembre 2012	139
Figura 4.9	Modelo de crecimiento de la <i>Rhodococcus equi</i> correspondiente a (a) septiembre de 2012 y (b) julio de 2013	140
Figura 5.1	Esquema del diseño experimental utilizado en la investigación	158
Figura 5.2.	Adición de 15 ml de bacterias en 8 litros de agua artificial en la sección del reactor	159
Figura 5.3.	Escenarios de las variables ambientales sobre el crecimiento de la <i>Rhodococcus equi</i> a diferentes concentraciones 50 mg/L (●), 100 mg/L (◆), 150 mg/L (▲) y 200 mg/L (■). Las estaciones están representadas E1 (a), E2 (b), E3 (c), E4 (d), E5 (e).	160
Figura 5.4	Efecto de la Temperatura sobre el crecimiento de la Bacteria <i>Rhodococcus equi</i> . Escenario 1 ( _ ), Escenario 2 (◆), Escenario 3 (●), Escenario 4 (▲) y	161

	Escenario 5 (■). Las concentraciones están representadas 50 mg/L (a), 100 mg/L (b), 150 mg/L (c), 200 mg/L (d).	
Figura 5.5	Efecto del pH sobre el crecimiento de la Bacteria <i>Rhodococcus equi</i> . Escenario 1 ( _ ), Escenario 2 (▲), Escenario 3 (◆), Escenario 4 (■) y Escenario 5 (●). Las concentraciones están representadas 50 mg/L (a), 100 mg/L (b), 150 mg/L (c), 200 mg/L (d).	164
Figura 5.6	Efecto de la Salinidad sobre el crecimiento de la Bacteria <i>Rhodococcus equi</i> . Escenario 1 ( _ ), Escenario 2 (▲), Escenario 3 (◆), Escenario 4 (■) y Escenario 5 (●). Las concentraciones están representadas 50 mg/L (a), 100 mg/L (b), 150 mg/L (c), 200 mg/L (d).	167
Figura 5.7	Efecto de la agitación sobre el crecimiento de la Bacteria <i>Rhodococcus equi</i> . Escenario 1 ( _ ), Escenario 2 (▲), Escenario 3 (◆), Escenario 4 (■) y Escenario 5 (●). Las concentraciones están representadas 50 mg/L (a), 100 mg/L (b), 150 mg/L (c), 200 mg/L (d).	168
Figura 5.8	Crecimiento de la Bacteria <i>Rhodococcus equi</i> . A diferentes concentraciones 50 mg/L (◆), 100 mg/L (▼), 150 mg/L (■) y 200 mg/L (●). Las estaciones están representadas E1 (a), E2 (b), E3 (c), E4 (d), E5 (e).	170
Figura 5.9	Modelo de crecimiento de la <i>Rhodococcus equi</i> en los Escenarios más representativos. Escenario 1 (◆), Escenario 2 (■) y Escenario 3 (▲)	171
Figura 5.10	Relación de la DQO con respecto al crecimiento de la cepa <i>Rhodococcus equi</i> . (Escenario 1), DQO (■)	173

y UFC/mg/L (◆).

Figura 5.11. Relación DQO con respecto al crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi* en el reactor. (Escenario 2), DQO (■) y UFC/mg/L (◆).

174

## Índice de Tablas

<b>Tabla</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Tabla 1.1	Derrame de sustancias contaminantes registradas en el Sistema Portuario Nacional por tipo (en galones). Año 2008-2009	11
Tabla 2.1	Estudios sobre la afectación que causan los puertos sobre los ecosistemas marinos.	32
Tabla 2.2	Estaciones de Muestreo	44
Tabla 2.3	Muestreo Enero 2011 Visita exploratoria	36
Tabla 2.4	Muestreo Febrero 2011	36
Tabla 2.5	Muestreo Noviembre 2011	37
Tabla 2.6	Muestreo Abril 2012	37
Tabla 2.7	Muestreo Mayo 2012	38
Tabla 2.8	Muestreo Febrero 2013	38
Tabla 2.9	Valores Promedios de los parámetros físicos químicos y microbiológicos medidos en el ámbito superficial en la Bahía de Manzanillo desde enero 2011 a febrero 2013	39
Tabla 2.10	Cuadro comparativo de las normas internacionales sobre la calidad de aguas marinas y costeras	41
Tabla 2.11	Escala de valores del CIAM y su relación con la calidad del agua para la vida acuática	56
Tabla 2.12	Valores promedio de la concentración media de los parámetros estudiados e índice de calidad integral del agua (CIAM) en sitios de la Bahía de Manzanillo. Periodo 2011-2013	57
Tabla 3.1	Clasificación de las partículas del suelo	78
Tabla 3.2	Valores relativos en porcentajes de materia orgánica	79
Tabla 3.3	Extracción de Hidrocarburos y compuestos derivados del petróleo	80
Tabla 3.4	Tiempos de retención de los 3 tipos de PAH estudiados	86
Tabla 3.5	Condiciones Cromatografías	87
Tabla 3.6	Porcentaje de las diferentes fracciones granulométricas obtenidas en los sedimentos superficiales de la Bahía de Manzanillo	90
Tabla 3.7	Valores de materia orgánica (como porcentaje del peso	92

	seco) en el sedimento de analizados en esta investigación.	
Tabla 3.8	Valores de pH, temperatura y coliformes en el sedimento de la Bahía en el Periodo lluvioso (a) y seco (b)	94
Tabla 3.9	Porcentaje de Recuperación de los analitos y sus respectivas concentraciones.	96
Tabla 3.10	Hidrocarburos y concentraciones encontradas en la Bahía de Manzanillo	99
Tabla 4.1	Principales géneros más comunes de levaduras, hongos y bacterias que tienen la capacidad degradadora del petróleo.	115
Tabla 4.2	Estudios reportados algunos microorganismos como potenciales degradadores de hidrocarburos aromáticos policiclicos en zonas marinas costeras	117
Tabla 4.3	Condiciones ambientales que afectan la degradación	123
Tabla 4.4	Características de las cepas que se encuentran en la zona	135
Tabla 4.5	Constante cinética de saturación determinada por el Modelo de Monod en la biodegradación de Naftaleno	141
Tabla 5.1	Escenarios con las diferentes variables estudiadas	156
Tabla 5.2	Eficiencia en el Escenario 1.	175
Tabla 5.3	Eficiencia en el Escenario 2.	176

## Índice de Anexos

<b>Anexo</b>		<b>Página</b>
<b>A1</b>		<b>185</b>
<b>A1.1.</b>	<b>Estaciones, Puntos de Muestreo, Periodo de muestreo y Justificación de sitios</b>	<b>186</b>
<b>A1.2</b>	<b>Etapas de la Investigación</b>	<b>186</b>
<b>A2.1.</b>	<b>Resumen del Anteproyecto de Norma de Calidad de Aguas Marina Costera</b>	<b>189</b>
<b>A3.1.</b>	<b>Grafica de granulometría de la estaciones en la zona de estudio</b>	<b>199</b>
<b>A4.1</b>	<b>Regla de determinación del biocodigo</b>	<b>200</b>
<b>A4.2</b>	<b>Curva de Crecimiento de la Rhodococcus equi sobre el naftaleno. (Septiembre 2012).</b>	<b>203</b>
<b>A4.3</b>	<b>Curva de Crecimiento de la Rhodococcus equi sobre el naftaleno. (Julio 2013).</b>	<b>204</b>
<b>A4.4</b>	<b>Curva de Calibración del Crecimiento bacteriano en función de UFC/mL/absor.</b>	<b>205</b>
<b>A5.1</b>	<b>Cromatógrama de la muestra del reactor al inicio del ensayo 2 a las 48 horas.</b>	<b>207</b>
<b>A5.2</b>	<b>Cromatógrama muestra del reactor tomada al inicio del Ensayo 5 a las 192 horas.</b>	<b>207</b>
<b>A5.3</b>	<b>Imágenes de las actividades y equipos del la investigación</b>	<b>209</b>

## Introducción

Se estima que el 85 ó 90 por ciento del total de vertidos de hidrocarburos al mar proviene de limpieza de depósitos y sentinas; derrames de pequeño o mediano tamaño en operaciones de carga y descarga, pequeños accidentes, rotura de depósitos, entre otros. Una vez que el petróleo y sus derivados se han introducido al medio ambiente, actúan sobre los organismos vivos y producen efectos adversos que dependen de la concentración y el tiempo de exposición. Entre los hidrocarburos más peligrosos para el ambiente se encuentran los hidrocarburos alifáticos como los aromáticos, pero particularmente los aromáticos policíclicos (HAPs) por sus niveles de toxicidad y menor degradabilidad. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Comunidad Económica Europea (EEC) han considerado, 16 compuestos HAPs de los no sustituidos, como contaminantes prioritarios. En los ecosistemas acuáticos los HAPs en concentraciones bajas, aproximadamente 0,1  $\mu\text{g/g}$ , retarda la división celular y el crecimiento del plancton. En concentraciones mayores a 1,0  $\mu\text{g/g}$  produce la muerte de gran cantidad de organismos y especies fitoplanctónicas, así como larvas y huevecillos de peces. Entre los principales efectos del consumo accidental de hidrocarburos sobre la salud de la población humana se encuentran el vómito, depresión del sistema nervioso central, daños hepáticos y cáncer; finalmente, altas concentraciones (10 ml/kg corporal) de los HAPs pueden causar la muerte (Albert, 2002).

Cuando los hidrocarburos interactúan con el ambiente sufren los procesos llamados de transformación, degradación y cambio de fase, los cuales involucran principalmente volatilización, disolución, emulsionamiento y sedimentación (La Grega et al., 2001). La cinética de degradación y transporte de compuestos orgánicos (i.e. los hidrocarburos) va a depender de su tipo de estructura y peso molecular, y de las características físicas, químicas y biológicas del ambiente.

Los microorganismos que cuentan con la capacidad de degradar biológicamente los hidrocarburos están distribuidos considerablemente en la naturaleza, debido a la contaminación crónica producida a lo largo de los años, por el petróleo, ha provocado la adaptación de la microflora del lugar para metabolizar estos compuestos. Los microorganismos que se utilizan en los tratamientos de efluentes hidrocarbureados son desarrollados en ciertas condiciones ambientales que incluyen el control de factores fisicoquímicos y fuentes de carbono (Nievas, 2006). Cuando las condiciones ambientales son marcadamente diferentes a las existentes durante su desarrollo, los microorganismos no son universalmente adaptables a distintos residuos. Se ha demostrado que los microorganismos autóctonos obtenidos de residuos de sentina de Puerto Madryn son capaces de degradar los hidrocarburos presentes en estos residuos, utilizando reactores en lote (batch) con un medio de agua de mar y diferentes cantidades conocidas de fase oleosa de residuo de sentina como fuente de carbono. En estos sistemas, donde los hidrocarburos son degradados, se conoce que la velocidad de degradación está íntimamente ligada con la biodisponibilidad de los hidrocarburos (Nievas et al., 2006).

La Zona del Canal de Panamá (ZCP) representa aproximadamente el 5% del transporte mundial, transitando entre 13,000 y 14,000 buques al año con todo tipo de carga (González, 2008). La Bahía de Manzanillo (adyacente a la ZCP), localizada en la parte central del Caribe, provincia de Colón, Panamá, en las coordenadas 9°22'10"N, 79°53'10"W; cuenta con una superficie aproximada de 8.24 km<sup>2</sup>, profundidad promedio de 35 pies, cuya conexión con el Océano Atlántico es la principal zona productiva de movimiento de contenedores para América Latina, desde Asia, Europa y la Costa Este y Oeste de los Estados Unidos. Sus aguas son afectadas por las siguientes fuentes de contaminación: descargas de aguas residuales domésticas provenientes del sistema de alcantarillado de la ciudad, vertimiento de residuos industriales y derrames de residuos petrolíferos como las descargas de aguas de lastre provenientes de los

buques que arriban a los puertos que comparten la Bahía de Manzanillo (Grey, 2007).

Anteriormente no se han encontrado registros de investigaciones sobre microorganismos capaces de degradar hidrocarburos, en una zona canalera, portuaria y franca; razón por la cual, es necesario investigar la biodisponibilidad de estos microorganismos, y modelar su cinética de degradación, de forma tal que sirva como herramienta para el tratamiento biológico y remediación de sitios contaminados por estos compuestos bajo las presiones antropogénicas existentes en la citada zona. Esta investigación está basada en un enfoque interdisciplinario fundamentado en la ingeniería-química-microbiología, es una línea de investigación que requiere ser desarrollada en el país.

Las aguas residuales industriales son aquellas que proceden de los procesos tecnológicos y se caracterizan por su generación periódica o continua en grandes volúmenes, así como por su variada composición. La caracterización de las aguas residuales es un aspecto muy importante, ya que permite evaluar el impacto ambiental que producen, de modo que sea posible diseñar el sistema adecuado para su tratamiento y/o aprovechamiento (Pérez *et al.*, 2004).

El principal origen de los HAP en las aguas se debe al derrame e infiltración de petróleo. Las aguas residuales domésticos e industriales suelen contener altos contenidos de HAP particulados y solubles (García, 2005<sup>b</sup>).

La razón de realizar la presente investigación se basa en el aumento de la contaminación originada por las descargas de aguas residuales industriales y/o derrames accidentales, de compuestos de difícil biodegradación, como los hidrocarburos, especialmente los aromáticos policíclicos, a los ecosistemas marinos y la falta de estudios encontrados en Panamá sobre biodegradación de los mismos. El objetivo principal es la determinar la capacidad depurativa de hidrocarburos mediante la velocidad de consumo y de crecimiento de los

microorganismos en sedimentos y columna de agua en la zona portuaria, como base para la aplicación en sistemas de tratamiento biológico utilizando como caso de estudio la Bahía de Manzanillo, Colón, Panamá.

Esta investigación propone el desarrollo en función de los puntos siguientes: a. Caracterizar la Bahía de Manzanillo en su agua superficial: fisicoquímico y microbiológicamente, y en sedimento, Físico y Microbiológico; b. Determinar de Hidrocarburos en sedimento: mediante extracción soxhlet y cromatografía de gases; c. aislar e identificar de bacterias con mayor capacidad degradativa de los hidrocarburos: determinar en sedimento microorganismos capaces de degradar 5 tipos de hidrocarburos específicos aromáticos entre bajo y alto logaritmo octanol agua y peso molecular: tolueno, naftaleno, pireno fenantreno y hidrocarburos totales; utilizados como fuente única de carbono. d. determinar mediante un modelo cinético aplicado (monod o Andrew), su cinética de degradación. e. Realizar un análisis de sensibilidad multivariable bajo distintas condiciones ambientales: pH, temperatura, oxígeno y salinidad). f. simular el tratamiento utilizando las bacterias aisladas en un reactor continuo.

Esta investigación aportará información fundamental que ayudará en la toma de decisiones para el manejo de sedimentos contaminados con compuestos altamente tóxicos, como son algunos HAP. Por un lado, se incrementará nuestro conocimiento de los niveles de contaminación sedimentos marinos de las costas caribeñas panameñas, asociados a zonas intermareales de uso recreativo o localizado en zonas portuarias. Por otro lado, se identificarán y se cuantificarán las poblaciones de bacterias autóctonas degradadoras de hidrocarburos presentes en los sedimentos marinos, así como también estudiar los posibles factores limitantes del proceso biodegradativo de estos compuestos.

## ***Capítulo I***

### ***Marco Conceptual***

## **1. Marco Conceptual.**

Desde los estudios pioneros de ZoBell (1946) en ambientes marinos, se han aislado numerosas cepas bacterianas de ambientes litorales y oceánicos capaces de degradar diferentes hidrocarburos (Atlas, 1981; Leahy y Colwell, 1990; Van Hammel *et al.*, 2003 y Watanabe, 2001).

El concepto de biorremediación en el contexto de la biodegradación es un proceso que ocurre de forma natural y es substancial su definición; siendo la biodegradación de gran importancia en el desgaste de los componente del petróleo y es un proceso natural por el cual las bacterias u otros microorganismos alteran y descomponen las moléculas orgánicas en otras sustancias, con el tiempo la producción de ácidos grasos y dióxido de carbono (Hoff, 1993).

*Biorremediación* es la aceleración de este proceso mediante la adición exógena de las poblaciones microbianas, a través de la estimulación de las poblaciones indígenas o por medio de manipulación de los medios contaminados mediante técnicas como la aireación o el control de la temperatura (Atlas, 1995; Hoff, 1993; Swannell *et al.*, 1996).

Los hidrocarburos (HC) son un clase de compuestos naturales que no solo pueden ser encontrados en áreas contaminadas por petróleo y sus derivados, sino que cantidades relativamente bajas pueden ser halladas en suelos y sedimento, derivados de la biosíntesis por parte de plantas, insectos y algunos microorganismos (Rosenberg, 2006) y se consideran como los compuestos de origen natural más estables.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son lipofílicos, es decir, se mezclan con más facilidad que el agua con el aceite. Los compuestos más grandes son menos solubles en agua y menos volátil. Debido a estas propiedades, los HAP en el medio ambiente se encuentra principalmente en las sustancias del

suelo, sedimentos y aceitosa, en lugar de en el agua o el aire. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos ha designado a 32 HAP como contaminantes prioritarios (Habib, F., 2010).

Las zonas costeras que reciben contaminación debido a la actividad antropogénica, contienen elevadas concentraciones de nutrientes, contaminantes orgánicos y trazas de metales pesados (Fang et al., 2006). La degradación de la calidad del agua marina relacionadas con estas causas, generalmente tienen sus orígenes en las cantidades de aguas residuales que son descargadas al océano, sin ningún tipo de tratamiento (Bay, et al., 2003; Fang et al., 2006).

Numerosas son las fuentes de procedencia de los hidrocarburos, entre ellas los efluentes urbanos e industriales, la explotación y transporte de petróleo crudo y sus derivados, el vaciado de sentinas de los buques y otras operaciones relacionadas con el tráfico marítimo y los puertos. Tanto los hidrocarburos alifáticos como aromáticos son peligrosos para el ambiente, pero particularmente los aromáticos policíclicos HAP por sus niveles de toxicidad y menor degradabilidad, las zonas portuarias son las que presentan mayor nivel de contaminación por estos compuestos (Esteves *et al.*, 2003).

Durante las últimas décadas se han visto incrementados los trabajos que utilizan microorganismos nativos de los lugares contaminados que han adquirido capacidad para sobrevivir en ese medio, tomando como fuente de sustrato los compuestos del petróleo que se han vertido en su hábitat (Oudot *et al.*, 1987); o bien la capacidad que muestran bacterias para degradar específicamente ciertos compuestos cuyas moléculas son de bajo peso molecular como el Octametilciclotetrasiloxano, en donde los microorganismos bajo condiciones anaeróbicas, biodegradan en aguas negras a éste en Dimetilsilanediol (Grümping *et al.*, 1999).

Los HC en el medio ambiente se biodegradan primeramente por bacterias, levaduras y hongos. Muchos estudios han reportados que la eficiencia de la biodegradación oscila entre el 6% (Jones *et al.*, 1970) a 82% (Pinholt *et al.*, 1979) para hongos del suelo, 0,13% (Jones *et al.*, 1970) a 50% (Pinholt *et al.*, 1979) para las bacterias del suelo, y 0,003% (Hollaway *et al.*, 1980) y el 100% (Mulkins *et al.*, 1974) de bacterias marinas.

Diversas investigaciones postulan que las cianobacterias tienen la capacidad de oxidar HC, Al-Hasan y colaboradores (1998), mostraron que cultivos no axénicos de *Microcoleus chthonoplastes* y *Phormidium corium* aislados a partir de sedimentos contaminados del Golfo de Arabia eran capaces de degradar *n*-alcanos; y estudios en *Oscillatoria sp.* y *Agmenellum quadruplicatum*, demostraron su capacidad de oxidar naftaleno (Cerniglia *et al.*, 1979, 1980).

Cuando las sustancias se encuentran en contacto directo con la superficie de la célula microbiana, se tiene como resultado altos niveles de degradación del hidrocarburo, así las bacterias y los hongos filamentosos atacan frecuentemente a las gotas de alcano dispersando el aceite y haciéndolo más susceptible al ataque microbiano, no obstante, el aumento de disponibilidad puede causar problemas de toxicidad (Coorson, 1995).

La mayoría de estudios en la genética del metabolismo de hidrocarburos han identificado que los genes implicados en la degradación están codificados en su mayoría en plásmidos tanto para la degradación de alcanos como de HAP. Bacterias, cianobacterias, algas y hongos, son capaces de degradar HC aromáticos policíclicos de bajo (dos o tres anillos) o alto peso molecular (cuatro o más anillos) como naftaleno, acenafteno, antraceno, fluoranteno, pireno y criseno y usarlos como única fuente de carbono (Leahy y Collwel, 1990; Van Hamme *et al.*, 2003), y benzo(a) pireno por cometabolismo.

Se han realizado muchos estudios sobre biodegradación de hidrocarburos aromáticos en los cuales se han obtenido resultados favorables en la degradación de compuestos como fenol (Collins y Daugulis, 1997), Tolueno (Collins y Daugulis, 1999) y Benceno (Yeom y Daugulis, 2001). Recientemente se estudian la degradación en compuestos HAPs como el Fenentreno, Pireno, Antraceno y Naftaleno, utilizando microorganismos hidrofóbicos adheridos en la fase oleosa (Macleod y Daugulis, 2005).

El presente trabajo ha sido motivado por la cantidad reducida de investigaciones en las regiones portuarias, canaleras y de clima tropical, a nivel de caracterizaciones integrales de la calidad del agua y sedimento y el estudio de la biodegradación en ambiente marinos costeros, donde ha aumentado la contaminación de las aguas provocada por el vertido de hidrocarburos. La información recabada permitirá desarrollar herramientas específicas como el Índice de Calidad del Agua en Ambientes Marino, y el procedimiento para evaluar el potencial biodegradativo de estos ambientes.

### **1.1. Antecedentes**

Distintos han sido los aportes de muchos científicos en el mejoramiento del conocimiento de cómo los microorganismos degradan hidrocarburos en distintos ambientes.

Buckley *et al.* (1976), aislaron bacterias y hongos de un ecosistema estuarino no poluido por petróleo o sus derivados, las especies bacterianas que mostraron capacidad de utilizar hidrocarburos de kerosene como única fuente de carbono fueron caracterizadas en los géneros *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Aeromonas*, *Micrococcus* y *Arthrobacter*.

Haigler, (1993), aisló la cepa *Pseudomonas sp.* 4 NT de un suelo contaminado con 4-nitro benceno y comprobó que esta cepa bacteriana tiene también una buena capacidad degradativa frente al nitrotolueno.

Dagher *et al.*, (1997), realizaron un estudio comparativo de cinco (5) cepas del suelo degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos; *Sphingomonas sp.* Cepa 107, fue la cepa con mayor capacidad degradadora, seguida de *Pseudomonas aeruginosa* cepas 57 y PL1.

Hanson *et al.*, (1997), en su estudio con la bacteria *Acinetobacter sp.* cepa A3 demuestran que esta cepa , en un tiempo de 120 horas bajo condiciones de agitación constante, en un suelo contaminado con petróleo (5%) es capaz de degradar los hidrocarburos del petróleo crudo, logrando un porcentaje de eficiencia del 70%.

Korda *et al.*, (1997), indicaron que los métodos analíticos para medir la biodegradación de hidrocarburos de petróleo varían en efectividad; concluyendo que la reintroducción de microorganismos nativos, parece ser el método de biorremediación más efectivo.

Margesin y Schinner, (1997), evaluaron la eficiencia de la biodegradación con microorganismos nativos del suelo, un inóculo psicrotrófico degradador de diesel y el efecto de la bioestimulación por medio de la fertilización inorgánica. Determinaron que la bioestimulación por fertilización, incrementa la biodegradación del diesel por bacterias nativas.

Merino, (1998), llevó a cabo un estudio de microorganismos nativos productores de emulsificantes de petróleo, indicando que los microorganismos con mayor capacidad emulsificante y degradativa, fueron las cepas: *Pseudomonas aeruginosa* KT1-1y *Serratia rubidae* BT5-4.

Belloso, (1999), evalúa el porcentaje de biodegradación durante el proceso “landfarming” (biolabranza), usando microorganismos exógenos y microorganismos nativos sin aplicación de fertilizantes. La eficiencia de la degradación fue del 84% (con microorganismos exógenos).

Parales, (2000), evaluó la capacidad degradativa y reacción quimiotáctica de cinco cepas, determinando que la *Pseudomona putida*, degrada de manera eficaz los hidrocarburos.

Margesin y Schinner, (2001), investigaron la factibilidad de la biorremediación, como tratamiento opcional de suelos contaminados con hidrocarburos. El nivel inicial de contaminación fue reducido aproximadamente en un 50% y 70% en suelo no fertilizado y fertilizado respectivamente.

Mishra *et al.*, (2001), analizaron el potencial de la biorremediación de un consorcio bacteriano en suelos pertenecientes a una refinería, dividieron el terreno de estudio en bloques, en los bloques donde se aplicó el consorcio bacteriano y nutrientes se observó un porcentaje de biodegradación de 90.2%, mientras que el que no se aplicó sólo un 16.8%.

Nwachukwu, (2001), inoculó *Pseudomona putida* en suelos contaminados con petróleo, adicionando nutrientes inorgánicos en algunos y el porcentaje de mayor efectividad de degradación fue de 27,5% en suelos no fertilizados y de 98,8% en suelos fertilizados.

Escalante, (2002), desarrolló un estudio sobre la biodegradación del crudo de petróleo en 3 terrarios, en el primero se inoculó el consorcio exógeno sin fertilizantes logrando una biodegradación del 92.5%; el segundo terrario se conformó por bacterias nativas con una biodegradación del 60%, y en el tercer terrario que correspondía al control abiótico, la biodegradación fue del 55%.

Collins y Daugulis, (2003), realizaron un estudio de degradación de una mezcla de Tolueno y Benceno, determinando la factibilidad de degradar dos compuestos químicos simultáneamente en un sistema bifásico.

Abalos *et al.*, (2004), estudiaron los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* AT10, determinando que la adición de los mismos, acelera la biodegradación de hidrocarburos del petróleo en un 61% en 10 días de incubación.

Bracho *et al.*, (2004), llevaron a cabo un estudio respecto a la degradación bacteriana sobre naftaleno, antraceno, fenantreno y dibenzotiofeno; determinando que el 100% de cepas, degradaron el naftaleno y antraceno, el 78.5% fenantreno, el 71.42% dibenzotiofeno y 50% los cuatro hidrocarburos.

Pardo *et al.*, (2004), midieron la efectividad de la biolabranza (landfarming), durante 4 meses, adicionando fertilizantes inorgánicos, obteniendo al finalizar el experimento, un porcentaje de remoción de hidrocarburos del 91%.

Maki *et al.*, (2005), reportaron en su estudio que la fotooxidación aumenta la biodegradabilidad de los hidrocarburos de petróleo al aumentar su biodisponibilidad y mejorando así actividades microbianas.

Head *et al.* (2006), determinaron que uno de los factores de suma importancia en la recuperación de ambientes marinos contaminados con hidrocarburos, es la presencia de microorganismos con capacidad de utilizarlos como fuente de carbono y energía.

Lee *et al.*, (2007), llevaron a cabo estudios de degradación donde determinaron que es al incrementar la densidad microbiana en un suelo contaminado, se puede también acelerar la degradación de los contaminantes orgánicos como los hidrocarburos.

Kumar *et al.*, (2007), reportaron en su estudio la importancia de la adición sustrato durante la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y biosurfactante bajo condiciones de alta salinidad.

## 1.2. Justificación

La Zona del Canal de Panamá (ZCP) representa aproximadamente el 5% del transporte mundial, transitando entre 13,000 y 14,000 buques al año con todo tipo de carga (Grey, 2007). Las principales actividades económicas de la Zona involucran la gestión de una franja canalera, portuaria, turística y comercial. La Bahía de Manzanillo adyacente a la ZCP (Figura 1.1), se encuentra localizada en la parte central del Caribe, provincia de Colón, Panamá, en las coordenadas 9°22'10"N, 79°53'10"W, y cuenta con una superficie aproximada de 8.24 km<sup>2</sup>, profundidad promedio de 35 pies (Grey, 2007).

Sus aguas son afectadas por las siguientes fuentes de contaminación: descargas de aguas residuales domésticas provenientes del sistema de alcantarillado de la ciudad, vertimiento de residuos industriales y derrames de residuos petrolíferos como las descargas de aguas de sentinas provenientes de los buques que arriban a los puertos que comparten la Bahía de Manzanillo (Grey, 2007).

El periodo y las estaciones de muestreo se encuentran definido en el anexo A1.1.

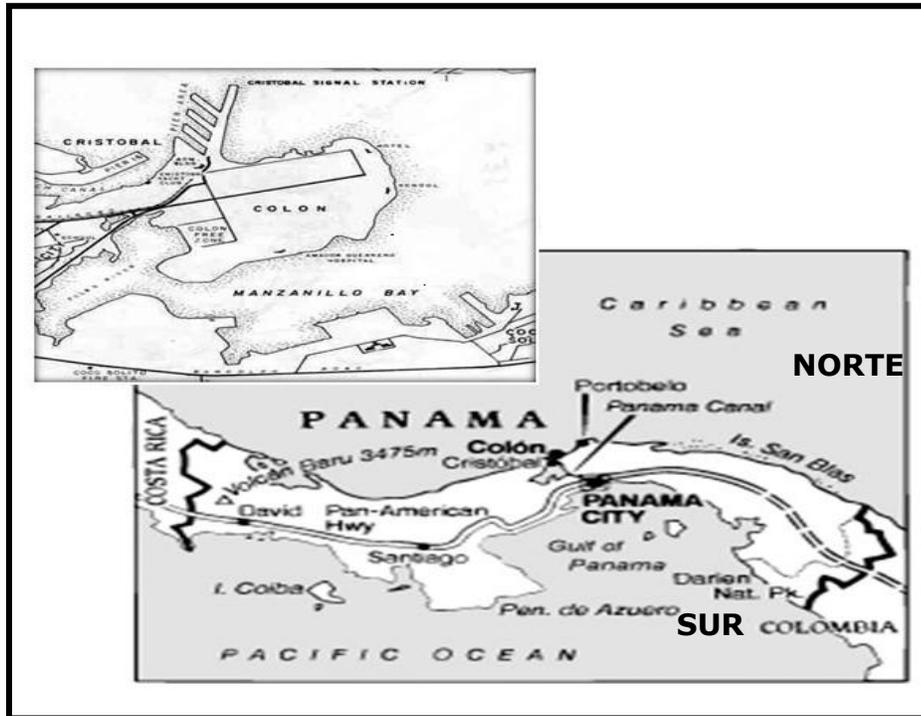


Figura 1.1. Mapa de la Zona de Estudio

Según registros de la Autoridad Marítima de Panamá en el año 2009, la empresa Ocean Pollution Control (OPC) ha reportado y atendido unos 350 derrames de hidrocarburos en costas Panameñas, sin contabilizar los que no se reportan y los que ocurren en mares territoriales adyacentes. Cada año un alto porcentaje de barcos que usan el Canal de Panamá e instalaciones portuarias tienen derrames o vertidos (Tabla 1.1).

En las regiones donde están las instalaciones portuarias en la zona de tránsito interoceánico y la zona de cabotaje de hidrocarburos de nuestras costas; la contaminación por hidrocarburos supera los 2.8 mg/L hasta 7.5 mg/L, es decir, niveles de contaminación por encima de los estándares internacionales (URS Holdings, Inc., 2005).

Toda la actividad de movimiento de embarcaciones, de almacenamiento y de trasiego aumenta el riesgo de derrames. Según la lista del U.S. Energy Information Administration (2006), (USEIA), de grandes derrames en el Gran Caribe (incluyendo Estados Unidos, Centroamérica, el Caribe y el norte de Sudamérica), 2 de los 17 derrames ocurrieron en Panamá.

Anteriormente no se han encontrado registros de investigaciones sobre microorganismos capaces de degradar hidrocarburos, en una zona canalera, portuaria y franca; y tampoco sobre presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos en zonas costeras de Panamá.

**Tabla 1.1. Derrame de sustancias contaminantes registradas en el Sistema Portuario Nacional por tipo (en galones). Año 2008-2009**

<b>Tipo de Contaminantes</b>	<b>Cantidad/2007-2008</b>	<b>Cantidad/2008-2009</b>
Aceite de Pescado	--	380.0
Aceite Hidráulico	11.0	9.3
Agua Aceitosa	1.0	30.0
Bunker C	895.0	103.0
Concreto	--	15.0
Desechos Oleosos	1.0	1.0
Diesel	52.5	22.0
Diesel, Aceite	70.26	1,125.0
Fuel Oil	10.0	43.0
Mezclas Oleosas	5.0	3,332.0
Tallow (Sebo)	--	2.0
Gasolina	2,086.0	--
Lubricantes	21.0	--
IFO 380	10.0	--

AMP, Cuadro estadístico 2007-2009

Para el entendimiento de la dinámica de los sistemas ecológicos y de la transformación de la materia y energía, es clara la necesidad del reconocimiento y descripción de los organismos que están implicados en estos procesos. Esto incluye el conocimiento de cuántos están implicados, en qué momentos y, junto con quiénes realizan los procesos, así como los cambios que los factores externos ejercen sobre la estructura y composición de las comunidades de estos organismos; donde dentro de ésta dinámica, las poblaciones bacterianas en el suelo constituyen un componente fundamental (Habib, F., 2010).

Considerando las principales actividades económicas de la región que involucran la gestión de una zona canalera, portuaria, turística y comercial; la eliminación de esta fuente de contaminación, contribuirá en gran medida con un modelo para el mantenimiento de las condiciones ambientales necesarias para el desarrollo de este tipo de actividades en el mundo.

Es preciso incrementar los estudios de laboratorio para evaluar correctamente los cambios químicos que ocurren en el petróleo, su degradación, y las alteraciones que ocurren por medio de factores bióticos y abióticos durante y después del derrame.

Es necesario investigar la calidad del agua de manera integral, la presencia de HAP y determinar la capacidad potencial que tiene la zona portuaria de biodegradar dichas sustancias. En los casos que se presente un derrame accidental de hidrocarburos, en zonas tropicales, se contará con una herramienta importante; para determinar la capacidad de degradación y asimilación del ambiente en caso de micro derrames de ciertas sustancias del tipo hidrocarburos de una forma biológica, sin residuos secundarios.

Este avance implica beneficios importantes para el fortalecimiento económico y social de las comunidades asentadas en zonas portuarias, como es el caso específico de la ZCP y las empresas marítimas y portuarias a nivel mundial, usuarias de los servicios; su conexión con el océano Atlántico es la principal zona productiva de movimiento de contenedores para América Latina desde Asia, Europa y la Costa Este y Oeste de los Estados Unidos.

### **1.3. Objetivos**

#### *1.3.1. Objetivo General*

Determinar el potencial de depuración de microorganismos en degradar hidrocarburos, para la aplicación a sistemas de tratamiento biológico en Zonas Portuarias: Caso de Estudio, Bahía de Manzanillo.

#### *1.3.2. Objetivos Específicos*

Caracterizar y analizar la calidad de las aguas en la Bahía de Manzanillo y áreas adyacentes, a través del análisis de sus propiedades físicas y composición química.

Determinar la presencia de Hidrocarburos en los sedimentos marinos y con particular énfasis en HAP considerados como contaminantes prioritarios por ser considerados las sustancias más contaminantes y peligrosas en el ambiente por sus niveles de toxicidad y menor degradabilidad, así como su influencia en los procesos de biodegradación.

Aislar e identificar microorganismos capaces de degradar Hidrocarburos presentes en sedimentos de la Bahía de Manzanillo.

Estudiar el modelo de crecimiento y la capacidad depurativa de los microorganismos aislados degradadores de hidrocarburos presentes en sedimentos de la Bahía de Manzanillo.

Realizar un análisis de sensibilidad multivariable bajo distintas condiciones ambientales: pH, temperatura, oxígeno y salinidad.

Simular el tratamiento de las bacterias aislados en un reactor en continuo.

#### **1.4. Hipótesis**

##### **Verdadera.**

Mediante la determinación del potencial depurativa de hidrocarburos por bacterias presentes en las de zonas portuarias, se puede definir la aplicación en sistemas de tratamiento biológico.

##### **Nula**

Al no encontrar bacterias presente en la zona portuaria capaces de degradar hidrocarburos, no es posible definir la aplicación en sistemas de tratamiento biológico.

##### **Alternativa**

Mediante el análisis de la capacidad de las bacterias de degradar hidrocarburos, no es posible aplicarlos a sistemas de tratamiento biológico en la zona portuaria de la Bahía de Manzanillo.

#### **1.5. Alcance y Beneficios de la Investigación**

En Panamá, los procesos de biodegradación han sido enfocados principalmente al tratamiento de suelos. Este estudio se desarrolla en la Bahía de Manzanillo, provincia de Colón, considerada una de las principales Zonas Portuaria para América Latina. Bajo este marco de referencia, teniendo en cuenta que son pocas las investigaciones realizadas en Panamá a nivel de biodegradación en ambientes marino costeros, se desarrolla la presente investigación, que tiene como objetivo identificar y seleccionar bacterias aisladas de sedimentos del Caribe Panameño y evaluar su capacidad de degradación, con el fin de que posteriormente puedan ser aplicadas como una herramienta estratégica en el tratamiento biológico de ecosistemas contaminados en dicha zona o en regiones de igual característica.

El desarrollo de la presente investigación se sustenta a través de los siguientes capítulos: a. Caracterizar la Bahía de Manzanillo fisicoquímica y microbiológicamente en su agua superficial, y físico y microbiológicamente en sedimento; b. Determinar Hidrocarburos en sedimento: mediante extracción soxhlet y cromatografía de gases; c. Aislar e identificar de bacterias con mayor capacidad degradativa de los hidrocarburos: determinar en sedimento microorganismos capaces de tolerar y/o degradar 3 tipos de hidrocarburos específicos aromáticos entre bajo y alto logaritmo octanol agua y peso molecular: naftaleno, pireno y fenantreno utilizados como única fuente de carbono, como también analizar su influencia en los procesos de biodegradación; d. Determinar mediante un modelo cinético aplicado (Monod o Andrew) la cinética de crecimiento y potencial de degradación de HAP, específicamente naftaleno; e. Realizar un análisis de sensibilidad multivariable bajo distintas condiciones ambientales: pH, temperatura, oxígeno y salinidad); y, f. Simular el tratamiento utilizando las bacterias aisladas en un reactor en continuo.

Esta investigación aportará información fundamental que ayudará en la toma de decisiones para el manejo de agua y/o sedimentos contaminados con compuestos altamente tóxicos, como son algunos HAP. Por un lado, incrementará el conocimiento de los niveles de contaminación sedimentos marinos de las costas caribeñas panameñas, asociados a zonas intermareales de uso recreativo o localizado en zonas portuarias. Por otro lado, se identificarán y se cuantificarán las poblaciones de bacterias autóctonas degradadoras de hidrocarburos presentes en los sedimentos marinos, así como también estudiar los posibles factores limitantes del proceso biodegradativo de estos compuestos.

En el anexo A1.1 y 1.2 se presenta las fases de la investigación así como también el periodo de muestreo, la justificación de selección de puntos y las estaciones.

## 1.6. Referencias Bibliográficas

- [1] ABALOS, A., VIÑAS, M., SABATE, J., MANRESA, M. y SOLANAS, M., [2004]. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. Springer Netherlands. 15 (4): 249-260.
- [2] AL-HASAN, R., AL-BADER, D., SORKHOH, N. y RADWAN, S., [1998]. Evidence for *n*-alkane consumption and oxidation by filamentous cyanobacteria from oil-contaminated coasts of the Arabian Gulf. *Mar Biol* 130: 521-527.
- [3] URS Holdings, Inc., [2005]. Estudio Científico y Técnico, Aguas Marinas y Costeras. Enero de 2005.
- [4] AMP, Autoridad Marítima de Panamá, Cuadro estadístico 2007-2009.
- [5] ATLAS, Ronald. M., [1981]. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol Rev* 45: 180.
- [6] ATLAS, Ronald M., [1995]. Petróleo Biodegradación y Biorremediación Derrames de Petróleo. *Boletín Contaminación Marina* 31, 178-182.
- [7] BAY, M., ZENG, Y., LORENSON, D., TRAN, K. Y ALEXANDER, C., [2003]. Temporal and spatial distributions of contaminants in sediments of Santa Monica Bay, California, *Marine Environmental Research*, 56, pp. 255–276, 2003.
- [8] BELLOSO, C., [1999]. Enhancement of hydrocarbons biodegradation rate during landfarming using exogenous microorganisms: A Field study. *Ex situ Biological Treatments Technologies*. Battelle Press (8): 64-76. USA.

[9] BRACHO, M., LAUGENY y LUZ, S., [2004]. Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado Zulia, Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas* 38 (3): 15-22.

[10] BUCKLEY, E., [1976]. Characterization of microbial isolates from an estuarine ecosystem: relationship of hydrocarbon concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*. 32(2):232-237.

[11] CERNIGLIA, C., GIBSON, D. y BAALLEN, C., [1979]. Algal oxidation of aromatic hydrocarbons: formation of 1-naphthol from naphthalene by *Agmenellum quadruplicatum*, strain PR-6. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 88: 50-58.

[12] CERNIGLIA, C., GIBSON, D. y BAALLEN, C., [1980]. Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. *Journal of General Microbiology* 116: 495-500.

[13] COLLINS, T. y DAUGULIS A., [1997]. Characterization and optimization of two-phase partitioning bioreactor for the Biodegradation of phenol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48:18-22.

[14] COLLINS, T. y DAUGULIS A., [1999]. BTX degradation part I: solvent selection and toluene degradation in two-phase partitioning bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:354-359.

[15] COLLINS, T. y DAUGULIS A., [2003]. Addressing biofilter limitations: A two-phase partitioning bioreactor process for the treatment of benzene and toluene contaminated gas streams. *Biodegradation*. 14:415-421.

[16] COORSON, T., [1995]. *Bioremediation engineering design and application*. McGraw-Hill, Inc. New York.

[17] DAGHER, F., DEZIEL, E., LIRETTE, P. y BISAILLON, J., [1997]. Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbonated soils. *Canadian Journal of Microbiology*. 43(4): 368-377.

[18] ESCALANTE, R. [2002]. Biodegradación de Crudo de Petróleo en Terrarios. Tesis para optar al grado de Magíster. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú.

[19] ESTEVES, J., OLIVERA, N., COMMENDATORE, M. y DELGADO, O., [2003]. Microbial characterization and hydrocarbon biodegradation potential of natural bilge waste microflora. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30 : 542 – 548.

[20] FANG, H., HWANG, J., HSIAO, S. Y CHEN, H., [2006]. Trace metals in seawater and copepods in the ocean outfall area off the northern Taiwan coast, *Marine Environmental Research*, 61, pp. 224–243, 2006

[21] GREY, A., [2007]. Estudio Comparativo de la Calidad de las Aguas Costeras Durante el Periodo Seco y Lluvioso en la Bahía de Manzanillo en la Ciudad de Colón, Universidad Tecnológica de Panamá, Panamá.

[22] GRÜMPING, R., MICHALKE, K., HIRNER, A. y HENSEL, R., [1999]. Microbial degradation of octamethylcyclotetrasiloxane. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (5):2276-2278.

[23] HABIB, F., [2010]. Evaluación de la diversidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de suelos de las cuencas de los ríos Otún y la Vieja. Universidad nacional de Colombia. Microbiología interfacultades, Febrero de 2010.

[24] HAIGLER, B., [1993]. Biodegradation of 4-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain 4NT. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(7): 2239-2243.

[25] HANSON, K., ANURANJINI, N. y KAPADIA, M., [1997]. Bioremediation of Crude Oil Contamination with *Acinetobacter* sp. A3. *Current Microbiology*. 35: 191-193.

[26] HEAD I., JONES, D. y RÖLING, W., [2006]. Marine Microorganisms Make a Meal of Oil. *Natura Reviese*. 4: 173-182.

[27] HOFF, Rebecca Z., [1993]. Biorremediación: una visión general de su desarrollo y uso de limpieza de derrames de petróleo. *Contaminación Marina Boletín* 29, 476-481.

[28] HOLLAWAY, S., FAW, G. y SIZEMORE, R., [1980]. The bacterial community composition of an active oil field in the Northwestern Gulf of Mexico, *Marine Pollution Bulletin*, 11, 6, pp 153–156.

[29] JONES, J., KNIGHT, M. y BYRON, J., [1970]. “Effect of gross population by kerosene hydrocarbons on the microflora of a moorland soil,” *Nature*, vol. 227, p. 1166.

[30] KORDA A., SANTAS P., TENENTE A. y SANTAS R., [1997]. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48(65): 677-686.

[31] KUMAR, M., LEON, V., MATERANO, S. y LLZINS, O., [2007]. A halotolerant and thermotolerant bacillus sp. degrades hydrocarbons and produces tensio-active emulsifying agent. *World J. Microbiol. Biotech.*, 23 (2), 211-220 (10 pages).

[32] LEAHY, J. G. y COLWELL, R., [1990]. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbio Rev.* 54: 305-315.

[33] LEE, S., LEE, S., KIM, D. y KIM, J. G., [2007]. Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient conditions. *J. Hazard. Mater.* 143, 65-72.

[34] MARGESIN, R. y SCHINNER, F., [1997]. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in Alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2660-2663.

[35] MARGESIN, R. y SCHINNER, F., [2001]. Bioremediation (Natural attenuation and biostimulation of Diesel-oil contaminated soil in Alpine Glacier Skiing area. U.S.A. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(7).

[36] MACLEAOD, C. y DAUGULIS, J., [2005]. Interfacial effects in two-phase partitioning bioreactor: degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a hydrophobic Mycobacterium *Process Biochemistry*. 40:1799-1805.

[37] MAKI, H., SASAKI, T., HARAMAYA, S., [2005]. Photooxidation of biodegradable crude oil and toxicity of the photooxidized products. *Chemosph.* 44:1145-1151.

[38] MERINO, F., [1998]. Estudio de microorganismos nativos productores de Emulsificantes de Petróleo. Tesis para optar al título de Magister . UNMSM. Lima-Perú.

[39] MISHRA, S. y JIOT, J., [2001]. In situ bioremediation potential of and oil sludge degrading bacteria consortium. *Current Microbiology*. 43 : 328-335.

[40] MULKINS, J., PHILLIPS, J., [1974]. Stewart Distribution of hydrocarbon utilizing bacteria in northwestern Atlantic waters and coastal sediments. *Can. J. Microbiol.*, 20: 955–962.

[41] NWACHUKWU, S., [2001]. Bioremediation of Sterile Agricultural Soils Polluted with Crude Petroleum by application of de soil bacterium, *Pseudomonas putida*, with Inorganic Nutrient Supplementation. *Current Microbiology*. 42: 231-236.

[42] OUDOT, J.; FUSEY, P.; ABDELOUAHID, D. E.; HALDOU, S. y ALBERT, M.F., [1987]. Capacités dégradatives de bactéries et de champignons insules d'un sol contaminé par un fuel. *Can. J. Microbiol* 33:232-243.

[43] PARALES, R., [2000]. Toluene degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene and trichloroethylene. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(9): 4098-4104.

[44] PARDO, J., PERDOMO, R. y BENAVIDES, L., [2004]. Afecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *NOVA* 2: 44-49.

[45] PINHOLT, Y., STRUWE, S. y KJOLLER, A., [1979]. Microbial changes during oil decomposition in soil, *Holarctic Ecology*, 2, pp 195–200.

[46] ROSENBERG, E., [2006]. Hydrocarbon-oxidizing organisms. *Prokaryotes*, 2: 564-577.

[47] SWANNEL, Richard P; LEE, Kenneth; McDONAGH, Madeleine, [1996]. Field Evaluations of Marine Oil Spill Bioremediation. *Microbiological Reviews* 60, 342-365.

[48] U.S. DEPARTMENT OF ENERGY, (USEIA), [1999]. *Environmental Benefits of Advanced Oil and Gas Exploration and Production Technology*.

[49] VAN HAMME, J. D.; SINGH, A. y WARD O. P., [2003]. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 503-549.

[50] WATANABE, K., [2001]. Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* 12: 237-241.

[51] YEOM, S. y DAUGULIS, A., [2001]. Benzene degradation in two-phase partitioning bioreactor by *Alcaligenes xylosoxidans* Y234. *Proc. Biochem.* 36:765-772.

[52] ZOBELL, C. E., [1946]. Actions of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol Rev.* 10: 1-49

## **Capítulo II**

### ***Caracterización del agua marina y costera de la Bahía de Manzanillo***

## **2. Caracterización del agua marina y costera de la Bahía de Manzanillo**

### **2.1. Introducción**

#### *2.1.1. Generalidades del Agua Marino Costero*

La protección del medio marino constituye una preocupación creciente en el ámbito científico y social, y el estudio continuo de las condiciones ambientales marinas, es generalmente, una de las tareas que todos los países deben cumplir para poder prevenir y adoptar las medidas necesarias para reducir la contaminación, ya que en última instancia, las consecuencias pueden tener un alcance global, en sus distintas facetas.

Las costas soportan una importante actividad urbana e industrial por lo que se ven continuamente amenazadas por diversos procesos contaminantes, figurando entre los más preocupantes, aunque no los únicos, las mareas negras por vertidos de hidrocarburos. La vertiente atlántica soporta un intenso tráfico de buques petroleros lo que implica un alto riesgo de vertidos crónicos y/o accidentales que requieren un continuo seguimiento. En el mundo, los vertidos accidentales como el del producido por el B/T Prestige en Noviembre de 2002, representan un porcentaje muy pequeño respecto al total de fuentes de contaminación marina por hidrocarburos (Albaigés, 2007); sin embargo, en el área afectada se originan graves consecuencias para la vida acuática, al liberarse grandes cantidades de petróleo y sus derivados, en un periodo de tiempo muy corto, por lo que requieren una atención especial.

#### *2.1.1.1. Contaminación del agua marino costera*

La contaminación del medio acuático significa la introducción por parte del hombre, ya sea de manera directa o indirecta, de sustancias o energía que

producen efectos nocivos, entre ellos, daños a los recursos vivos (biológicos), riesgo para la salud humana (patógenos) (Kiely, 1999).

Los puertos también afectan la calidad del agua marina, mediante la realización de múltiples actividades entre ellas el dragado de su canal de navegación con el objetivo de mantener el calado adecuado para los buques y muchas veces ese material es descargado en el agua. Dicha actividad causa impactos ambientales asociados con la descarga del material en aguas en áreas confinadas o no, tales como: incremento de la turbidez, suspensión y distribución de contaminantes, disminución del oxígeno disuelto y ahogamiento y/o cobertura de los organismos vivos presentes en la zona de descarga (Landaeta, 2001).

La actividad portuaria requiere de servicios de carga/descarga, suministros, combustible, traslado de personal y reparaciones, lo que sumado a eventos de derrames crónicos de hidrocarburos e ingreso de residuos, hacen de las zonas portuarias sistemas fuertemente alterados con una alta presión ambiental y una paulatina alteración de la calidad de las aguas y sedimentos (Ahumada, 1995; Rudolph *et al.*, 2002; McCready *et al.*, 2003; Sprovieri *et al.*, 2007; Casado-Martínez *et al.* 2007).

#### 2.1.1.2. *Calidad del agua marino costero*

El concepto de calidad del agua es usado para describir las características químicas, físicas y biológicas del agua. La importancia que ha cobrado la calidad del agua ha permitido evidenciar que entre los factores o agentes que causan la contaminación de ella están: agentes patógenos, desechos que requieren oxígeno, sustancias químicas orgánicas e inorgánicas, nutrientes vegetales que ocasionan crecimiento excesivo de plantas acuáticas, sedimentos o material suspendido, sustancias radioactivas y el calor (Tin, 2005).

Entre los años 2000 y 2013, se ha encontrado un rango de oxígeno disuelto entre 5.5 y 8.6 mg/L; Coliformes totales entre 435.2 y 3700 UFC y Demanda Química de Oxígeno entre 0.3 y 5.2 mg/L, estos cambios de acuerdo a Grey *et al*, (2014) se deben presumiblemente a la mayor afluencia de barcos, dilución por efectos de las estaciones y del río Folks River.

Los puertos también son un foco de contaminación derivado de las distintas actividades que en estos se realizan. Como se observa en la Tabla 2.1 el oxígeno disuelto en puertos como el de Guayaquil, se encuentra en 1.69, muy cercano al valor de un agua residual (Kiely, 1999), a esta realidad no escapa Panamá.

**Tabla 2.1. Estudios sobre la afectación que causan los puertos sobre los ecosistemas marinos.**

PARÁMETRO FÍSICOQUÍMICO	VALOR	LUGAR	REFERENCIAS
Oxígeno Disuelto (mg/L)	7.07	Bahía de Cárdenas, Archipiélago Sabana-Camagüey, Cuba.	Montalvo et al., (2001)
Potencial de hidrogeno	8.5	El Golfo de Tehuantepec, área portuaria y zona costera de Salina Cruz, Oaxaca, México.	González et al.(2006)
Demanda Bioquímica de Oxígeno (mg/L)	1.69	Puerto de Guayaquil	Coloma (2010).

Finalmente a través de la revisión se ha observado que en los últimos años no hay actualización de los datos de calidad de agua; ni se ha encontrado un Plan de Manejo Ambiental para el Puerto de Manzanillo; sin embargo, en otros puertos como el de Guayaquil, Ecuador se posee una Guía de Gestión Ambiental (Coloma, 2010), la cual fue creada basándose en Marpol 73/78 y las normas ambientales que rigen en el país, respectivo.

## *2.1.2. Análisis del Agua Marino Costera*

### *2.1.2.1. Parámetros Físicos.*

#### **Temperatura**

La temperatura del agua salina de los océanos varía con la profundidad. La temperatura del agua del océano cerca de la superficie varía desde aproximadamente 21 °C (70 °F) hasta 2.3 °C (36 °F), según la estación del año y la latitud. La temperatura del agua afecta a algunas de las principales propiedades físicas y características de las aguas, tales como densidad, peso específico, viscosidad, tensión superficial, capacidad termal, entalpía, presión de vapor, conductividad específica, conductancia, salinidad y solubilidad de los gases disueltos (Mays,1996).

La temperatura es la medida de la energía cinética media que tienen las moléculas de agua. Es el parámetro más visible y a la vez más fácil para su obtención, siendo también considerada representativa del estado del océano y la primera causante de los cambios en los procesos fisiológicos de diferentes especies marinas. La temperatura del agua de mar generalmente oscila entre 2 °C y 30 °C y con valores extremos entre -4 °C y +42 °C.

#### **Turbiedad**

El término turbio se aplica a las aguas que contienen materia en suspensión que interfiere con el paso de la luz a través del agua, o aquellas en las aguas en la que está restringida la visión de la profundidad. La turbiedad puede ser causada por una gran variedad de materiales en suspensión, de tamaño variable entre las dispersiones coloidales y las gruesas, dependiendo del grado de turbiedad. A medida que los ríos progresan hacia el océano pasan por áreas urbana, donde se les suma residuos domésticos e industriales, tratados y sin tratar; éstos pueden

contribuir a la turbiedad con grandes cantidades de sustancias orgánicas e inorgánicas (Sawyer *et al.*, 2001).

Las algas, los sedimentos en suspensión (arcillas, limos, partículas de sílice) y la materia orgánica en el agua pueden aumentar la turbidez hasta niveles peligrosos para ciertos organismos (Chapman y Kimstach, 1992). La turbidez aumenta con la erosión de las orillas, con el crecimiento excesivo de las algas y con los cambios en el flujo del río. También crece por la actividad de algunos organismos bentívoros, que resuspenden los sedimentos (Lindig-Cisneros y Zambrano, 2007).

### **Sólidos Totales:**

Todos los contaminantes del agua, con excepción de los gases disueltos, contribuyen a la “carga de sólidos”. Pueden ser de naturaleza orgánica y/o inorgánica (Higuera y Wong, 2009).

#### *2.1.2.2. Parámetros Químicos*

### **Demanda bioquímico de oxígeno (DBO<sub>5</sub>)**

La Demanda bioquímico de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) es un índice importante del medio ambiente para determinar los requerimientos de oxígeno relativo de las aguas residuales, efluentes y aguas contaminadas. Se refiere a la cantidad de oxígeno requerido por las bacterias y otros microorganismos en la degradación bioquímica, demanda bioquímica de oxígeno y la transformación de la materia orgánica en condiciones aeróbica. La DBO<sub>5</sub> es también interpretada como una medida de la concentración de materia orgánica que puede servir como un sustrato para apoyar el crecimiento de microorganismos.

El valor de DBO<sub>5</sub> se determina comparando el valor de oxígeno disuelto (OD) de una muestra de agua tomada inmediatamente con el valor de la muestra incubada

descrita anteriormente. La diferencia entre los dos valores de OD representa la cantidad de oxígeno requerido para la descomposición de material orgánico en la muestra y es la mejor aproximación del nivel de la DBO<sub>5</sub>. La DBO<sub>5</sub> se mide en ppm o mg/L (Chapman y Kimstach, 1992; APHA, 1995; Bain, 1999).

### **Oxígeno Disuelto (OD)**

La concentración de oxígeno es relevante en el control de la calidad de las aguas, siendo su presencia y concentración esencial para sustentar las formas superiores de vida, como también para evaluar los efectos de potenciales agentes contaminantes, principalmente por el balance de oxígeno en el sistema.

Es igualmente relevante en los procesos de degradación contemplados en los tratamientos de aguas residuales y en los procesos de corrosión de tuberías. (Rivera *et al.*, 2004).

El oxígeno disuelto está relacionado, principalmente, con la temperatura del agua y los sólidos en suspensión. La temperatura determina la solubilidad del oxígeno en el agua, aumentando ésta al disminuir la temperatura. En cuanto a los sólidos en suspensión, son partículas de tamaño hasta 1 micra que bloquean la luz solar, y evitan que las plantas acuáticas obtengan la luz solar que necesitan para la fotosíntesis. En consecuencia, las plantas producen menos oxígeno, y se reduce el nivel de oxígeno disuelto (Mota, 2004).

### **Potencial de Hidrogeno (pH)**

El pH es un término de uso general para expresar la magnitud de acidez o alcalinidad, es una medida de la concentración de iones de hidrógeno en el agua. Aguas fuera del rango normal de 6 a 9 pueden ser dañinas para la vida acuática (por debajo de 7 son ácidas y por encima de 7 son alcalinas). Estos niveles de pH

pueden causar perturbaciones celulares y la eventual destrucción de la flora y fauna acuática (Decreto Supremo No. 046-93-E M, 2006).

El pH permanece razonablemente constante a menos que la calidad del agua cambie debido a las influencias de tipo natural o antropogénica, aumentando la acidez o la basicidad. Como la mayor parte de las formas de la vida ecológica son sensibles a los cambios de pH, es importante que el impacto antropogénico sea minimizado. El impacto medio ambiental más significativo del pH comprende efectos sinérgicos (Chapman y Kimstach, 1992).

### 2.1.2.3. *Parámetros Microbiológicos*

#### **Coliformes totales**

Los organismos del grupo Coliforme, conocido como Coliformes totales, se define en bacteriología del agua como todos los aerobios y anaerobios facultativos que no forman esporas, son bacterias en forma de varilla que fermentan la lactosa con formación de gas dentro de las 48 horas a 35 °C.

Inconvenientes con el uso de Coliformes totales como indicador incluye su rebrote en el agua, convirtiéndose así en parte de la flora acuática natural. Su detención se convierte en un falso positivo, que puede ocurrir cuando la bacteria *Aeromonas*, que bioquímicamente imita el grupo Coliforme, está presente en la muestra.

El monitoreo de la calidad bacteriológica del agua mediante el uso del grupo de los coliformes es una herramienta necesaria para tomar decisiones sobre la idoneidad de un cuerpo de agua para el contacto humano (Caruso *et al.*, 2002; Fujioka, 2002). La estimación de estos microorganismos indicadores mediante la técnica de número más probable (NMP) en aguas recreacionales marinas y estuarinas, ha probado ser útil como herramienta para evaluar la calidad del agua (Olson, 1978).

## ***Escherichia coli***

Es un organismo indicador ideal en cuanto que tiene un largo periodo de supervivencia en un medio acuático (Kiely, 1999). Es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole (Neidhardt, 1999).

*Escherichia coli* es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez, 2002).

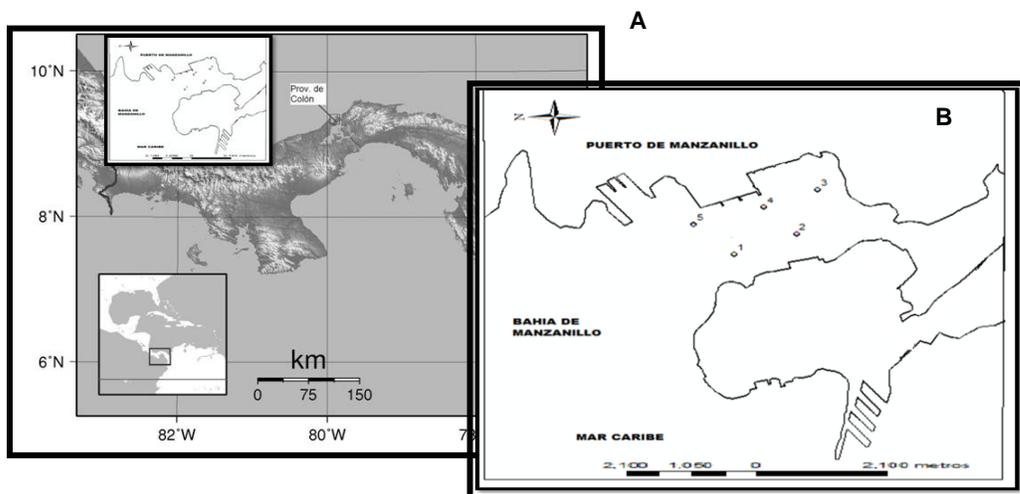
### **2.2. Objetivos**

Caracterizar y analizar la calidad física, química y microbiológica; de las aguas en la Bahía de Manzanillo y áreas adyacentes.

### **2.3. Métodos y materiales**

#### *2.3.1. Diseño Experimental*

Para la toma de muestras de agua y sus análisis, se utilizó el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005), realizando cinco (5) giras a la Bahía de Manzanillo (Figura 2.1.a) en la cual fueron tomadas las muestras en cinco (5) Estaciones representativas de la Bahía (Tabla 2.2), estos puntos (Figura 2.1.b) fueron escogidos tomando como referencia el sistema de boyas del canal de acceso de las terminales.



**Figura 2.1. a) Mapa de Panamá, ubicación de la Provincia de Colón; b) Ubicación de los Puntos de muestreo en la Bahía de Manzanillo Colón.**

Al llegar al sitio se toma la referencia de la posición del punto de muestreo utilizando un GPS Topcon Hiper +, para obtener los datos en coordenadas UTM (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2. Estaciones de Muestreo**

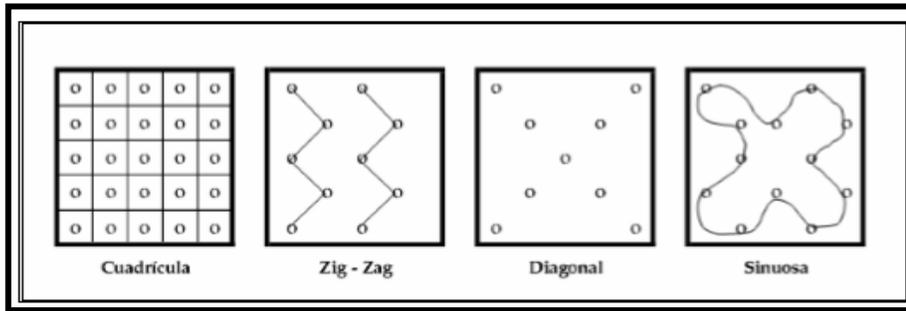
ESTACIONES	UBICACIÓN		JUSTIFICACIÓN DE LA SELECCIÓN DEL PUNTO
	GEOGRÁFICAS	UTM	
<b>Estaciones E1</b>	9°21'43.67"N 79°53'27.00"W	1035080.51 N 621796.52 E	Es un sitio con presencia de actividades industriales.
<b>Estaciones E2</b>	9°21'29.59"N 79°53'21.86"W	1034648.52 N 621954.69 E	Sitio mayormente ocupado por residencias
<b>Estaciones E3</b>	9°21'26.76"N 79°53'7.47"W	1034562.98 N 622394.87 E	Sitio de actividades comerciales.
<b>Estaciones E4</b>	9°21'38.96"N 79°53'12.75"W	1034937.21 N 622231.69 E	Sitio mayormente afectado por el tránsito de buques.
<b>Estaciones E5</b>	9°21'51.54"N 79°53'18.21"W	1035323.10 N 622063.91 E	Sitios de actividades portuarias

Las muestras fueron recolectadas en la superficie del agua en botellas plásticas de medio galón y también se recolectaron muestras en botellas para DBO<sub>5</sub> (Botellas Winkler) a las cuales se les agregó *in situ* 1 ml de solución de “sulfato manganoso” (Reactivo 1) y 1 ml de solución de “Alcali-yoduro” (Reactivo 2), evitando al máximo el contacto de las muestras con los tubos en los cuales se encuentran los reactivos, y serán selladas y almacenadas junto con las botellas plásticas en una nevera con hielo para mantener su temperatura cerca de los 20°C hasta llegar al Laboratorio de Sanitaria de la Facultad de Ingeniería Civil de la Universidad Tecnológica de Panamá (UTP) en donde serán refrigeradas para posteriormente realizar las pruebas de laboratorio.

En campo se procedió a medir la conductividad del agua superficial en cada punto de muestreo, utilizando un multiparámetro de calidad del agua marca YSI modelo 556 MPS. También en campo se midió transmisibilidad con un disco Secchi atado a una cuerda la cual fue dividida en metros y la misma también se utilizó para medir la profundidad de los sitios de muestreo. Y utilizando un pH metro, marca PCE modelo pH 209, se procedió a medir en campo el nivel de pH de cada uno de los sitios de muestreo de manera directa, introduciendo los electrodos en el agua donde se tomaron las muestras.

### 2.3.2. Toma de Muestra

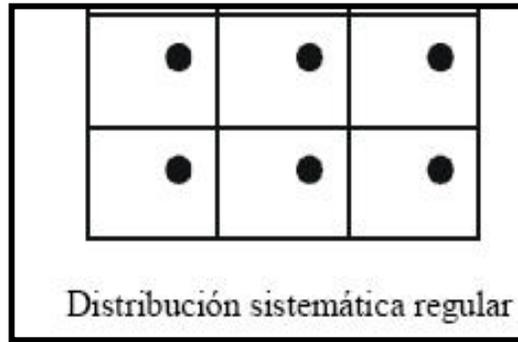
No hay un método único para toma de muestras, debido a la diversidad de ambientes naturales y de los distintos objetivos de análisis. De acuerdo a Atlas y Bartha, (2002) el recorrido a efectuar en la toma de muestra es de acuerdo a la Figura 2.2:



**Figura 2.2. Recorrido en toma de muestra en suelo y sedimento**

En el diseño del muestreo se consideraron tres elementos básicos: (1) la localización de los puntos de muestreo; (2) el número de puntos de muestreo y (3) el número de muestras en cada punto de muestreo. Dichos elementos se definieron de acuerdo a los objetivos de la investigación y a la información disponible.

La información previa obtenida del sitio a caracterizar, así como también las investigaciones realizadas en el lugar, apoyaron en la localización de los puntos a muestrear. Esto permitió establecer la hipótesis correspondiente a la distribución tanto horizontal como vertical de la zona a estudiar. El diseño de muestreo de la presente investigación supone la existencia de una interrelación entre la localización espacial y la concentración de alguna de las sustancias a estudiar en cada punto de muestreo, como también el conocimiento del área de estudio y otras variables que inciden en los resultados que se obtendrán. Este diseño se basa en una distribución sistemática regular (Figura 2.3), ya que cumple con los objetivos de la investigación. La ubicación de los puntos de muestreo es rígida con un punto por cuadro y en la misma posición por coordenadas geográficas (Figuras 2.2 b y Tabla 2.3).



**Figura 2.3. Modelo de Distribución de Puntos de Muestras**

### 2.3.3. Ensayos

La metodología utilizada en los ensayos de Potencial de Hidrógeno, Oxígeno disuelto, Sólidos Totales, DBO<sub>5</sub>, Temperatura, Escherichia coli, Coliformes totales, Turbiedad; fue la del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005). En el caso de la Transmisibilidad se utilizó La metodología más común involucra la utilización del disco de Secchi, un círculo de 20 cm de diámetro, dividido en cuadrantes pintados alternadamente de negro y blanco, atado a una cuerda graduada.

## 2.4. Resultados y Discusión

Las muestras de agua se tomaron a una profundidad media de  $0.36 \pm 0.12$  metros, es decir, se trató de muestras superficiales en todos los casos.

Los resultados que se describen a continuación son producto del análisis de cinco muestras, puntuales en tiempo y espacio de la Bahía de Manzanillo. Los análisis de C.T, DBO<sub>5</sub>, OD, S.T, S.S y Turbidez fueron realizados en el Laboratorio de Ingeniería Sanitaria de la Universidad Tecnológica de Panamá, mientras que el resto de los parámetros fueron medidos en campo (Tabla 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8).

**Tabla 2.3. Muestreo Enero 2011**  
**Visita exploratoria**

<b>Estaciones</b>	pH	Turbiedad (UTM)	Solidos Totales (mg/l)	Transmis.	Coliformes Totales (UFC)	E. coli (UFC)	DBO (mg/l)	OD (mg/l)	Temp. (°C)
<b>Estaciones E1</b>	7.75	5	33928	2.4	4.5	0.2	2.5	8	27
<b>Estaciones E2</b>	7.52	2	30320	1.9	5.4	0.5	1.3	7.8	28
<b>Estaciones E3</b>	7.6	4	34600	2	5.7	0.4	0.8	8.4	28
<b>Estaciones E4</b>	7.72	3	31122	1.85	6.1	0.9	1.3	8.2	29
<b>Estaciones E5</b>	7.66	5	32712	2	3.7	0.7	0.7	7.5	29

**Tabla 2.4. Muestreo Febrero 2011**

<b>Estaciones</b>	pH	Turbiedad (UTM)	Solidos Totales (mg/l)	Transmis.	Coliformes Totales (UFC)	E. coli (UFC)	DBO (mg/l)	OD (mg/l)	Temp. °C
<b>Estaciones E1</b>	7.48	3	S.D.	2.34	1.7	0.2	1.4	7.2	29
<b>Estaciones E2</b>	7.72	2	S.D.	2.31	8.7	0.2	0.9	7.8	30
<b>Estaciones E3</b>	7.74	3	S.D.	2.42	1.0	0.9	1.4	7.5	29
<b>Estaciones E4</b>	7.67	3	S.D.	2.22	1.9	0.3	1.5	7.39	30
<b>Estaciones E5</b>	7.61	2	S.D.	3.1	1.2	0.5	0.5	6.9	31

S.D.: Sin Datos

**Tabla 2.5. Muestreo Noviembre 2011**

<b>Estaciones</b>	pH	Turbiedad (UTM)	Solidos Totales (mg/l)	Transmis.	Coliformes Totales (UFC)	E. coli (UFC)	DBO (mg/l)	OD (mg/l)	Temp. (°C)
<b>Estaciones E1</b>	7.83	5	39446	2.4	4.2	1.6	0.8	5.9	28
<b>Estaciones E2</b>	8.01	2	24309.6	1.9	4.2	0.5	1.9	7.6	29
<b>Estaciones E3</b>	8.04	4	9816.0	2	2.2	0.3	2.4	5.9	29
<b>Estaciones E4</b>	8.04	3	28605.0	1.85	4.9	1.8	1.4	6.5	30
<b>Estaciones E5</b>	8.15	5	16452.6	2	1.1	0.4	2.3	6.0	28

**Tabla 2.6. Muestreo Abril 2012**

<b>Estaciones</b>	pH	Turbiedad (UTM)	Solidos Totales (mg/l)	Transmis.	Coliformes Totales (UFC)	E. coli (UFC)	DBO (mg/l)	OD (mg/l)	Temp. °C
<b>Estaciones E1</b>	8.23	4	3189	2	1.8	0.4	1.6	7.3	29.2
<b>Estaciones E2</b>	8.27	3	3105	2.3	1.8	0.2	0.7	7.4	28.2
<b>Estaciones E3</b>	8.32	3	3043	1.9	4.9	0.5	1.6	7.6	27.2
<b>Estaciones E4</b>	8.24	2	3160	2	0.5	0	1.7	8	27.4
<b>Estaciones E5</b>	8.22	4	3146	3	1.6	0.4	0.8	7.2	28.2

**Tabla 2.7. Muestreo Mayo 2012**

<b>Estaciones</b>	pH	Turbiedad (UTM)	Solidos Totales (mg/l)	Transmis.	Coliformes Totales (UFC)	E. coli (UFC)	DBO (mg/l)	OD (mg/l)	Temp. °C
<b>Estaciones E1</b>	7.92	4	2430.1	2.2	8.7	5.2	1.9	8.2	29
<b>Estaciones E2</b>	7.66	5	1894.3	2	8.7	4.8	1.4	7.9	30
<b>Estaciones E3</b>	8.20	2	1716.2	1.9	1.9	1.6	1.8	7.3	29
<b>Estaciones E4</b>	8.13	5	2712.4	1.8	1.1	0.7	1.7	8.2	30
<b>Estaciones E5</b>	7.89	3	2921.4	2.2	2.2	0.7	0.9	7.6	31

**Tabla 2.8. Muestreo Febrero 2013**

<b>Estaciones</b>	pH	Turbiedad (UTM)	Solidos Totales (mg/l)	Transmis.	Coliformes Totales (UFC)	E. coli (UFC)	DBO (mg/l)	OD (mg/l)	Temp. °C
<b>Estaciones E1</b>	8.15	5	S.D.	1.8	0.6	0.2	1.1	6.6	27.8
<b>Estaciones E2</b>	8.07	4	S.D.	2.3	0	0.2	1.3	7.3	27.5
<b>Estaciones E3</b>	8.16	3	S.D.	2.2	0.6	0.2	0.5	6.7	28
<b>Estaciones E4</b>	8.17	3	S.D.	1.8	0.8	0.3	0.2	6.9	28
<b>Estaciones E5</b>	8.19	4	S.D.	2.3	1.8	0.1	1.8	8.6	28

La Tabla 2.9 presenta los valores promedios de los parámetros físicos químicos y microbiológicos medidos en el ámbito superficial en la Bahía de Manzanillo desde enero 2011 a febrero 2013. Con el fin de determinar la calidad del agua de acuerdo a las normas y definir los posibles usos de la Bahía de Manzanillo, se procedió a analizar las normas existentes. Panamá no cuenta aún con normas para agua naturales solamente con una propuesta, por lo que se analizaron los resultados de calidad de agua en función del Anteproyecto y se incluyeron normas internacionales (Tabla 2.10).

**Tabla 2.9. Valores Promedios de los parámetros físicos químicos y microbiológicos medidos en el ámbito superficial en la Bahía de Manzanillo desde enero 2011 a febrero. 2013**

PARÁMETRO	UNIDAD	VALOR SEGÚN EL ANTEPROYECTO	VALOR OBTENIDO 2011-2013	
			SECO	LLUV.
Oxígeno Disuelto (OD)	mg/l	>4.0	6.6-8.6	5.9-8.2
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	mg/l		0.2-2.5	0.7-2.4
Sólidos Totales	mg/l (10 <sup>3</sup> )		3.1-3.4	1.7-4.0
Potencial de Hidrógeno (pH)		6.0 – 9.0	7.5-8.1	7.6-8.3
Temperatura (°C)	(°C)		27–31	27.2-31
Turbiedad	(NTU)	<25.0	2-5	2-5
Coliformes Totales	NMP/100ml)X10 <sup>3</sup>	<500	0-8.7	0.5-8.7
<i>Escherichia coli</i>	NMP/100ml)X10 <sup>3</sup>	<50	0-5.2	

La Tabla 2.10 recoge los valores admitidos en distintos países para cada uno de los parámetros que fueron considerados en este estudio, en contraste con los promedios de cada parámetro estudiado en el presente trabajo a nivel de estación, como de igual manera se observa que no todos los parámetros están regidos por una misma norma, dado que cada país regula los parámetros de acuerdo a sus condiciones locales y naturales.

También contiene los valores límites de cada método utilizado en campo y laboratorio de los parámetros anteriormente descritos en esta sección. Es necesario realizar en el futuro más monitoreo para obtener datos más precisos de estos parámetros. En lo que se refiere a los parámetros de pH, temperatura y

salinidad, éstos obedecen a condiciones locales, sin embargo se mantienen bajo el rango establecido en otros países.

Para realizar una comparación cónsona con la realidad de la Bahía de Manzanillo, se incluyó en este estudio y por la importancia del mismo, una definición clara con respecto al uso de las aguas de la Bahía de Manzanillo de acuerdo a la Norma de Calidad de aguas Salinas de Brasil, solo como referencia en aplicación dentro de nuestro estudio.

En consecuencia, en base al análisis de las causas potenciales de contaminación sobre las aguas marinas y a la comparación de los resultados obtenidos para el presente estudio (Tabla 2.10) se puede señalar que en Panamá, aún se encuentran las condiciones físicas químicas adecuadas para mantener la vida acuática.

**Tabla 2.10.**  
**CUADRO COMPARATIVO DE LAS NORMAS INTERNACIONALES SOBRE LA CALIDAD DE AGUAS MARINAS Y COSTERAS**

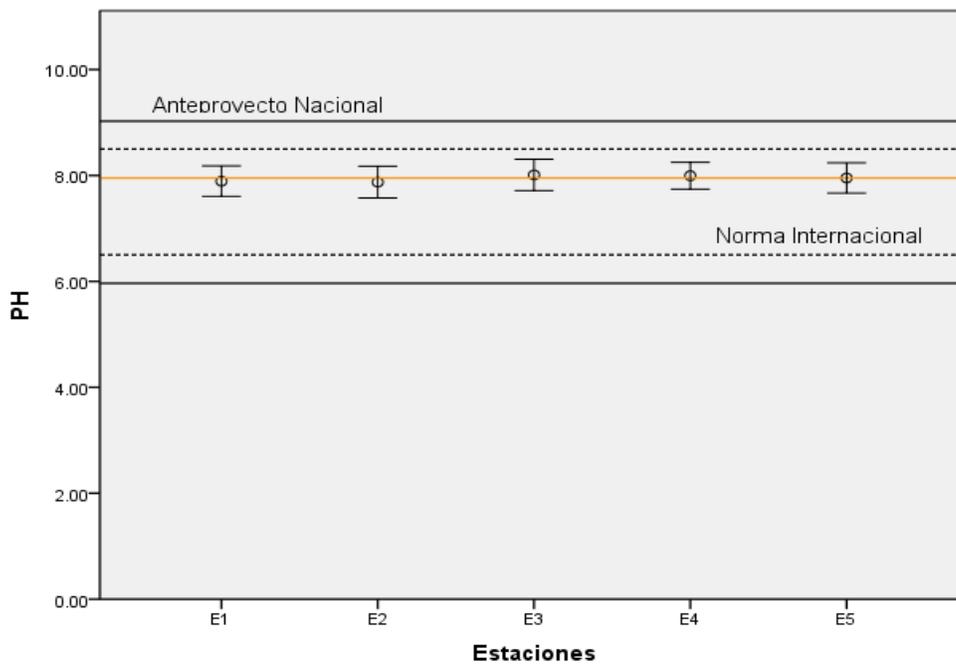
Parámetros	Bolivia	Ecuador	Colombia	Chile	Venezuela	Mexico	Puerto Rico	Carolina del norte	EPA	Florida	India	Promedio Norma Internacional	Panamá 2006
pH	6.0-8.5	6.0-9.5	6.5-8.5	6.5-8.5	6.5-8.5	----	7.3-8.5	6.8-8.5	6.8-8.5	6.8-8.5	6.8-8.5	6.9-9.0	6.0 – 9.0
Salinidad (ppm)	----	-----	-----	----	-----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Turbiedad (NTU)	<10	50-100	ND	50	-----	-----	10	25	10	29	----	29	<25.0
Temperatura (°C)	±31	32	----	30	-----	40	32	-----	<34	-----	45	35	28
Oxígeno disuelto (mg/l)	80% sat.	>5	4	>5	5	----	>5	>5	---	>5	4-5	4.5	>4.0
DBO (mg/l)	<2.0	-----	-----	3	-----	75	-----	-----	-----	-----	3	27	< 2.0
Coliforme Totales (NMP/100ml)	-----	200	1,000/5,000	-----	>70	-----	-----	-----	-----	=1,000	500/ 5000	1300	<500
E. Coli (NMP/100ml)	<1000	-----	-----	1000	-----	-----	200	200	----	200	----	420	<50

Fuentes: Coastal Water Quality Monitoring Manual 2001. Modificado por A. Grey, 2006. Panamá 2006 tiene que ver con los valores que dice el anteproyecto de normas de calidad de aguas naturales 2006

### 2.4.1. Calidad Física

#### Potencial de Hidrogeno (pH)

El pH registro un promedio de 7.94, siendo un valor máximo de 8.32 y un valor mínimo de 7.48 (Grafica 2.4). Las variaciones que se mostraron mantuvieron patrones comunes en las diversas estaciones y en los dos periodos climáticos (Tabla 2.10). El valor más bajo se registró en la E1, siendo predominante en el periodo seco. Por otro lado, el valor más alto se presentó en la Estación 3 periodo lluvioso.



**Figura 2.4. Potencial de Hidrogeno en la Bahía de Manzanillo desde enero 2011 a febrero 2013. (--- media de los valores de pH)**

En los dos periodos, tanto seco como lluvioso, de acuerdo a el promedio de las Normas Internacionales (Tabla 2.10) y URS Holdings (2006) en el anteproyecto de norma de calidad del agua marino costera en Panamá (Anexo A2.1) la calidad del agua es buena, excelente y aceptable a los largo de la Bahía de Manzanillo.

En términos generales los valores promedios para ambos periodos se encuentran dentro los valores normales para aguas marinas y costeras. Los valores de pH obtenidos estuvieron ligeramente por encima de 7.4, valor teórico indicado por Vetter (1976), quien afirma que, en las aguas superficiales marino costeras, el valor medio del pH es alrededor de 8. Además, este autor señaló que los valores más altos, por ejemplo 8.3, coinciden con valores elevados de oxígeno disuelto, comportamiento observado en este estudio.

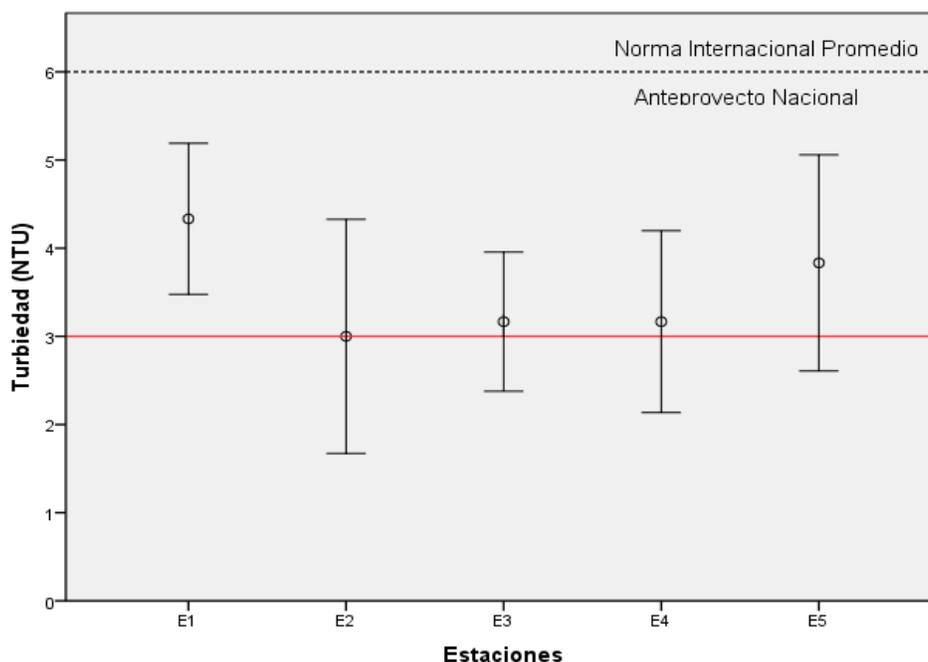
En los puertos internacionales como el Puerto Morelos los valores oscilaron entre 8.13 y 8.27 con un promedio de 8.24, y en el Puerto de Guayaquil los valores iban de 7.46 a 7.54 con un promedio de 7.48, todos los valores de ambos puertos son de tipo Básico o Alcalino y se encuentran dentro del el Anteproyecto de normas de calidad de agua Marinas y Costeras, siendo los valores del Puerto de Guayaquil los más semejantes a los valores encontrados en Manzanillo 2011 (Corro y Huertas, 2011).

### **Turbiedad**

Los valores registrados durante el muestreo en las diferentes estaciones y en ambos periodos oscilaron entre 2 a 5 NTU (Figura 2.5), donde el promedio más bajo se da en la E2 en el periodo lluviosa y seco, y el más alto en la E1 en el periodo seco también como promedio para ambas estaciones. La variación de los niveles de turbiedad registrados fueron causados, presumiblemente, por el arrastre de tierra, sedimentos y aguas residuales; sin embargo, cumplen con el promedio de las Normas Internacionales (Tabla 2.10) y el Anteproyecto de Calidad de Agua Marino Costera (URS Holdings, 2006).

Diferentes factores que pueden ser de origen natural o antrópico inciden en los incrementos de la turbidez en las aguas marinas costeras. Como se puede observar específicamente en la E2, donde se evidencia la mayor variación de la

turbidez ( $\pm 3$  NTU), la cual puede deberse a la influencia del Río Folks, que recibe descargas, pluviales, domésticas e industriales.



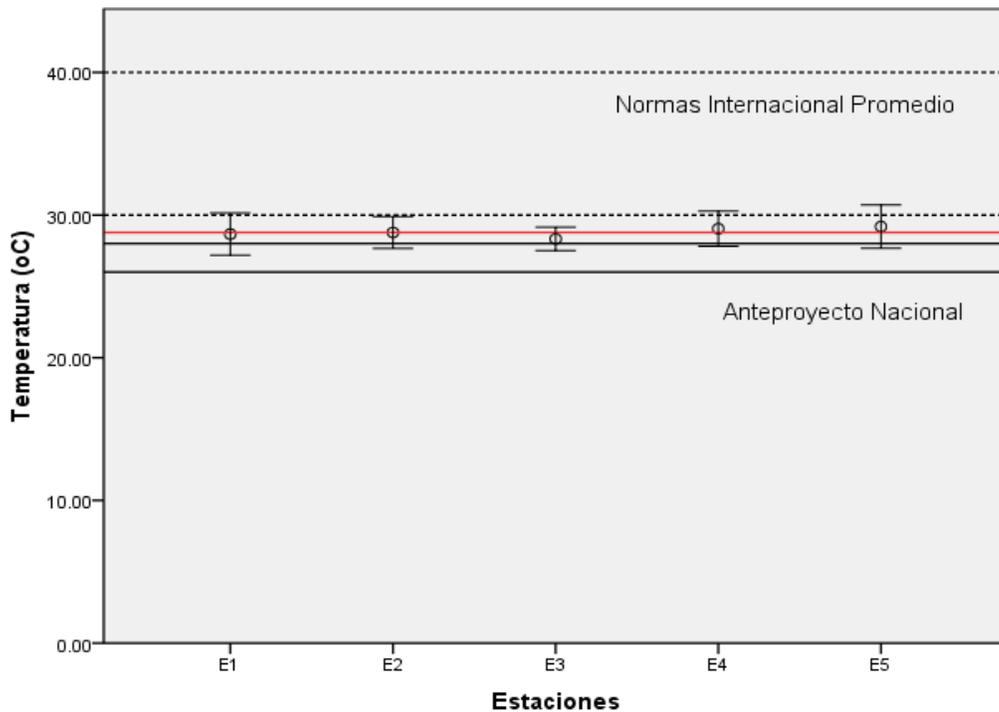
**Figura 2.5. Turbiedad en la Bahía de Manzanillo desde enero 2011 a febrero 2013. (--- media de los valores de turbiedad)**

### Temperatura (°C)

Las condiciones termohalinas en la línea de la costa, presentaron características diferentes en todas las estaciones y arrojaron diferencias significativas en las dos épocas climáticas. La temperatura tuvo un promedio de 28.7 °C y osciló entre 27.°C y 31°C, (Figura 2.6) dando como resultado la mínima en el periodo lluvioso en la E1 y en la E5, y la máxima en el periodo seco en todas las estaciones en los diferentes meses correspondientes a dicha estación. Dichos valores se encuentran por debajo del promedio de las Normas Internacionales ( $\pm 4$  °C) (Tabla 2.10) y ligeramente por encima ( $\pm 3$  °C) del Anteproyecto Nacional.

Este comportamiento es característico de las aguas de estuarios y zonas de mezclas de aguas dulces y de mar en regiones tropicales (Dublin-Green, 1992;

Akpan y Offem, 1993). Los resultados hallados en este estudio coinciden con los reportados en zonas costeras y bahías por López (2002) y Seisdedo (2007).



**Figura 2.6. Temperatura en la Bahía de Manzanillo desde enero 2011 a febrero 2013. (--- media de los valores de Temperatura °C).**

La temperatura de acuerdo a las normas consultadas, no debe excederse de ciertos límites para que no afecte los diferentes procesos del ecosistema. Algunos países como Bolivia y en el estado de Carolina del Norte, Estados Unidos de América se establecen límites inferiores y superiores sobre la temperatura estándar del área, mientras que en otros países como Chile, Ecuador, México y Puerto Rico y en organismos como la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (por su siglas en inglés USEPA), se establece un límite máximo superior permisible a la temperatura estándar del lugar donde rige la norma.

Al comparar los promedios obtenidos en la Bahía de Manzanillo con la Tabla 2.10, se observa que no sobrepasan los límites establecidos por los países consultados, lo cual coincide con Corro y Huertas (2011).

### Sólidos Totales:

Los sólidos totales tuvieron valores que oscilaron entre 1032 mg/L y 39446 mg/L dando como resultado la mínima en el periodo lluvioso en la E2, comprensiblemente por el efecto de la dilución producto del aumento de caudales por la influencia del Río Folks y la máxima en el periodo seco en la E1, por el predominio de las descargas de aguas residuales de la Ciudad de Colón (Grey 2007).

La Figura 2.7, muestra una concentración representativa de sólidos totales (de hasta  $\pm 40,000$  mg/L) provocando a su vez una disminución del OD, esto se debe a que una mayor cantidad de sólidos totales le proporciona al cuerpo de agua una mayor turbidez, impidiendo así el paso de la luz y disminuyendo la tasa fotosintética, lo que se ve reflejado directamente sobre la cantidad de oxígeno disuelto (Villarreal, 2009).

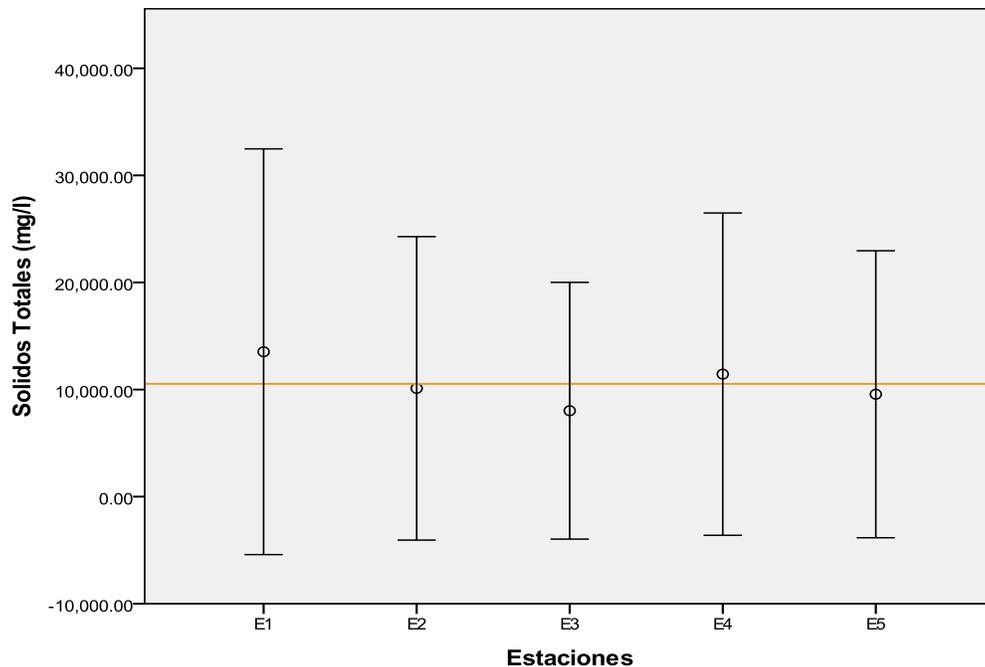


Figura 2.7. Sólidos totales en la Bahía de Manzanillo desde enero 2011 a febrero 2013. (--- media de los valores de Sólidos Totales)

## 2.4.2. Calidad Química

### Oxígeno Disuelto (OD)

En cuanto a los parámetros químicos, los valores de OD determinado para la Bahía de Manzanillo fluctuaron entre 6.0 y 8.6 mg/L (Figura 2.8). Observando la E2, el OD se mantuvo muy cerca de 8 mg/L con variación mínima ( $\pm 0.6$ ) y máxima ( $\pm 1$ ). Se estableció que este rango representa un criterio de calidad admisible para el uso de preservación de flora y fauna en aguas.

Por otra parte, las bajas concentraciones de oxígeno disuelto posiblemente están relacionadas con la descomposición de la materia orgánica y/o aporte de materia orgánica por escorrentías.

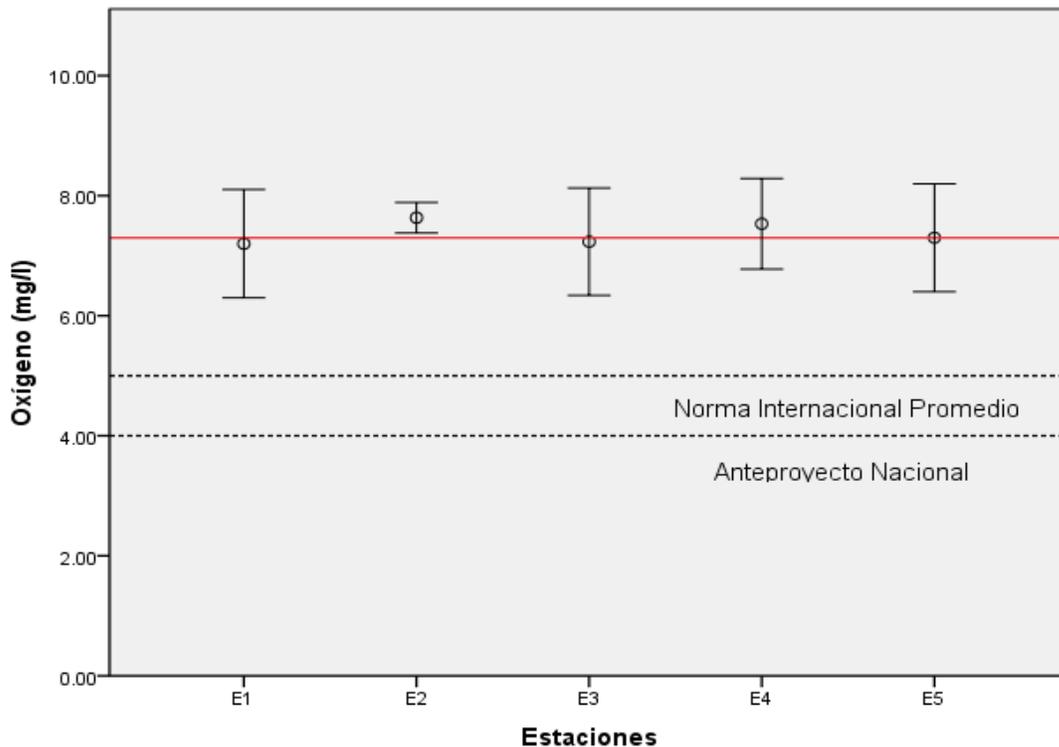


Figura 2.8. Oxígeno Disuelto en la Bahía de Manzanillo desde enero 2011 a febrero 2013. (--- media de los valores de oxígeno disuelto)

Las lecturas obtenidas en las E1 y E3 durante el periodo seco se realizaron en marea baja, donde los procesos de mezcla se vieron reducidos debido al estado de la misma.

Por otro lado, con respecto a la E5, durante la estación seca disminuyó el oxígeno disuelto, presumiblemente, producto de las primeras lluvias, que se dan en la época de transición entre marzo y abril, y/o a la alta concentración de sólidos suspendidos y sólidos totales en el área (Tabla 2.10).

El oxígeno disuelto durante la estación lluviosa registró valores elevados en la E5 dejando claro que otros factores como la movilización de tierra y la cercanía de este sitio a la constante afluencia de buques pudieron alterar los resultados obtenidos.

El oxígeno es un elemento crítico para la supervivencia de las plantas y animales acuáticos y la escasez de oxígeno disuelto, además de ser un indicador de contaminación, es dañino para los animales. La respiración de los organismos y la degradación bacteriana y química de la materia orgánica, reduce la concentración del oxígeno disuelto en las aguas.

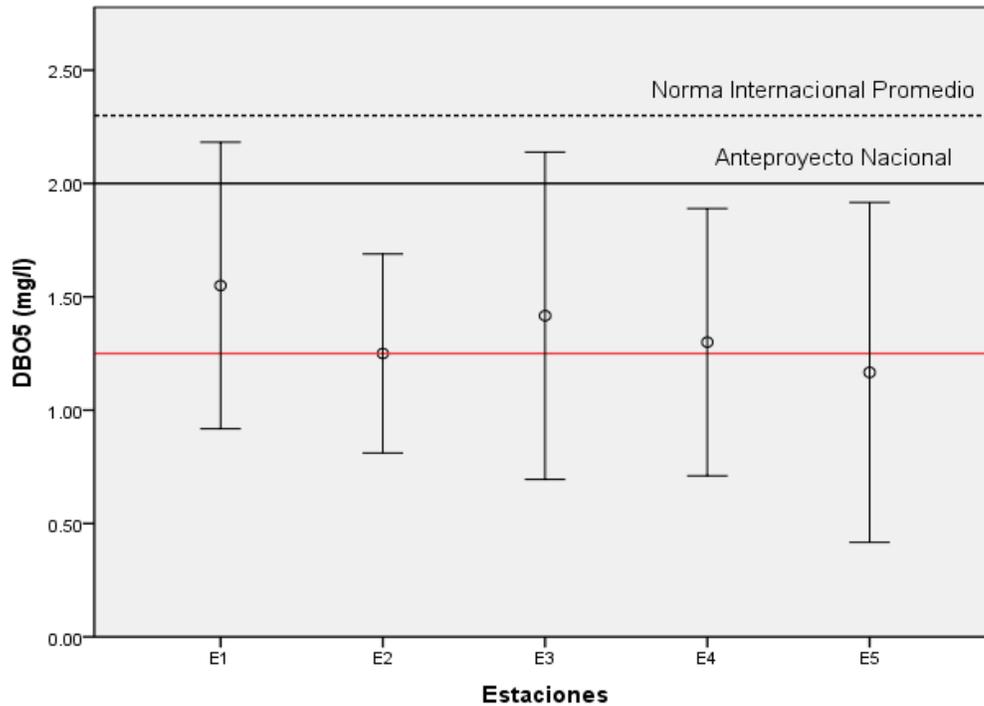
Mata (2011) obtuvo valores de oxígeno disuelto semejantes a este estudio, e indicó que la solubilidad del oxígeno en el agua aumenta por la presión parcial y disminuye cuando aumentaba la salinidad tal como se manifestó en este trabajo. Asimismo, Márquez (1999), indicó que el aumento de la temperatura en la superficie, por el efecto de la radiación solar, trae como consecuencia una alta producción de oxígeno por actividad fotosintética, tal como se muestra de acuerdo a los valores obtenidos.

Los valores de oxígeno disuelto observados en puertos internacionales como el Puerto Morelos oscilaron entre 5.34 y 6.82 mg/L, mientras que en el Puerto de Guayaquil los valores de oscilan entre 5.1 y 5.7 mg/L; sin embargo para este

estudio todo los valores se encuentran por encima del promedio de las Normas Internacionales (Tabla 2.10) y el Anteproyecto de Normas de Calidad de agua Marinas y Costeras de Panamá; lo cual es positivo, ya que de acuerdo a Kiely (1999) a mayor de concentración de OD, mejor calidad del agua.

### **Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>)**

La DBO<sub>5</sub> registró valores entre 0.3 y 2.5 mg/L con variaciones de hasta  $\pm 0.5$  mg/L (Figura 2.9). Los valores más bajos se presentan en la E1, tanto en la estación lluviosa como en la seca, cuyo valor es de 0.3 mg/L (Tabla 2.10).



**Figura 2.9. Demanda Bioquímica de Oxígeno en la Bahía de Manzanillo desde enero 2011 a febrero 2013. (--- media de los valores de DBO<sub>5</sub>)**

Cuando los niveles de DBO<sub>5</sub> son altos, hay una reducción en los niveles de OD. Esto sucede debido a que la demanda de oxígeno por parte de las bacterias es alta y ellas están tomando el oxígeno disuelto del agua.

Cabe señalar, que los valores obtenidos de  $DBO_5$  casi en su totalidad se encuentran por debajo del promedio de las Normas Internacionales (Tabla 2.10). En algunos lugares de muestreo se presentan valores elevados, tal es el caso del periodo seco y del lluvioso, en la E4 también se obtienen valores elevados a lo largo del muestreo (Figura 1.6). Es decir, este punto se encuentra influenciado por diversos factores como movimiento de tierra, aporte de efluentes desde las comunidades adyacentes y de los diferentes proyectos en construcción cercanos al área de estudio y por último menos dilución en época seca; sin embargo, se cumple con el promedio presentado en la Tabla 2.10.

En general, se puede observar que al disminuir la  $DBO_5$ , el OD aumenta, lo cual concuerda con distintos autores que sustentan la teoría del Modelo de Streeter-Phelps, que cuando aumenta la  $DBO_5$  el OD disminuye (Corbitt, 2003; Kiely, 1999 y Mihelcic, 2001).

A pesar de encontrarse en algunas estaciones valores para la  $DBO_5$  superiores a 1 mg/l, la zona de estudio presenta buena capacidad de autodepuración ya que se detectaron concentraciones muy cercanas y por encima del valor de saturación, lo que provoca que no hayan condiciones para la existencia de ambientes anóxicos que dificulten el desarrollo de la vida marina para  $DBO_5$  superiores a 2 mg/L (Montalvo y Perigó, 2000).

En la Figura 2.10, se presenta una distribución superficial de los parámetros físicos químicos que se hallaron en la Bahía de Manzanillo durante el período comprendido entre el año 2011 y 2013.

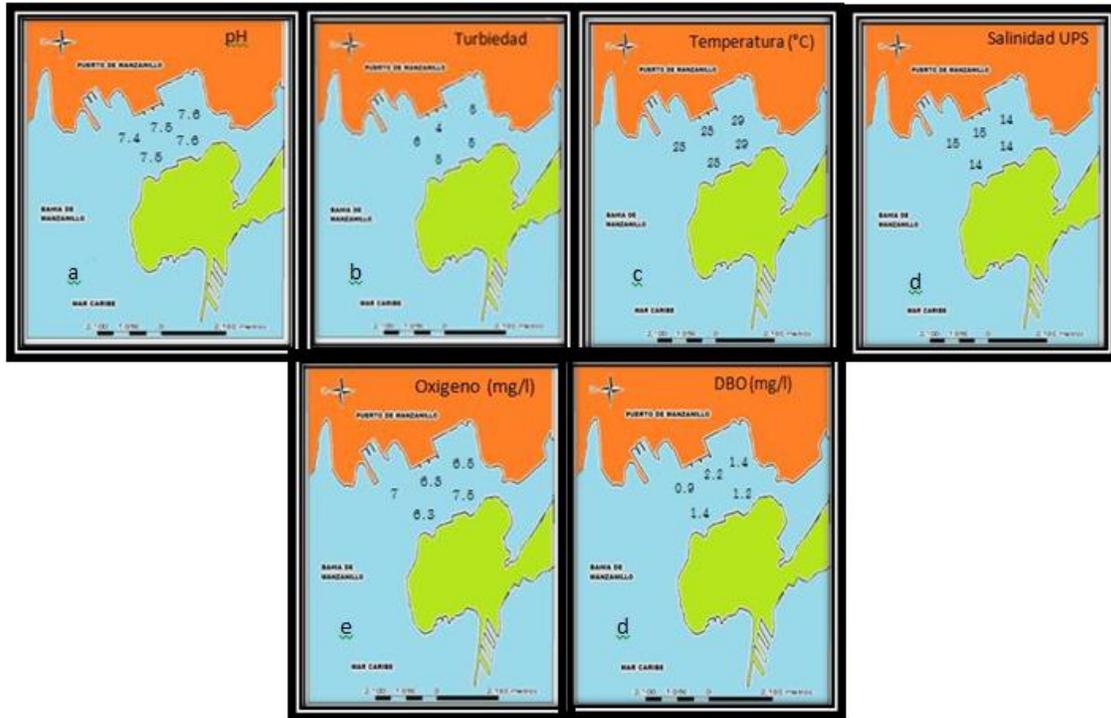


Figura 2.10. Distribución superficial de los parámetros físico químicos en la Bahía de Manzanillo (a. pH, b. turbiedad, c. temperatura, d. salinidad, e. oxígeno disuelto y f. DBO).

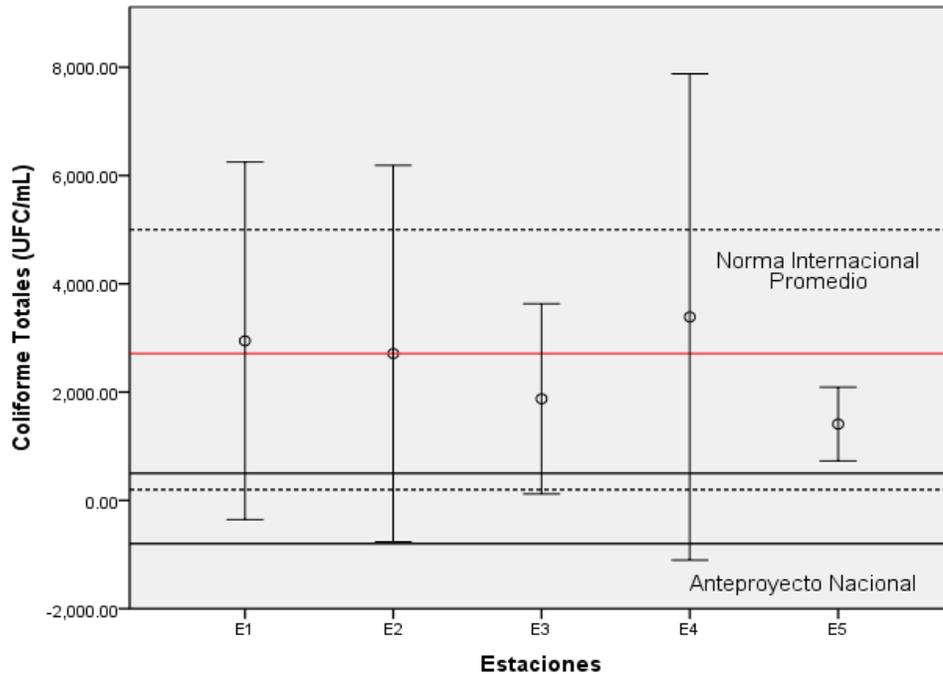
#### 2.4.3. Calidad Microbiológica

##### Coliformes Totales (C.T) y Escherichia Coli (E. Coli)

En cuanto a las Coliformes, los valores oscilaron entre  $0.4 \times 10^3$  a  $8.7 \times 10^3$  UFC (Figura 2.11), resultados que oscilan entre 1 y  $2.0 \times 10^3$  UFC para la estación seca y  $0.5 \times 10^3$  y  $8.7 \times 10^3$  UFC en la estación lluviosa. El valor más alto obtenido se registra en la E1 en la estación seca y el más bajo se presenta en la E5 durante la estación lluviosa (Tabla 2.9).

Shiaris *et al.* 1987, señalaron que en un área costera impactada por descargas de aguas de alcantarillado y lluvia, los recuentos de *Escherichia coli* fueron de 2 a 4 órdenes de magnitud mayores en sedimentos que en la columna del agua.

Mientras que los valores para C.T del puerto internacional de Morelos oscila entre  $5.0 \times 10^3$  y  $64 \times 10^3$  UFC con un promedio de  $33 \times 10^3$  UFC muy por encima de lo encontrado en La Bahía de Manzanillo en ambas investigaciones.

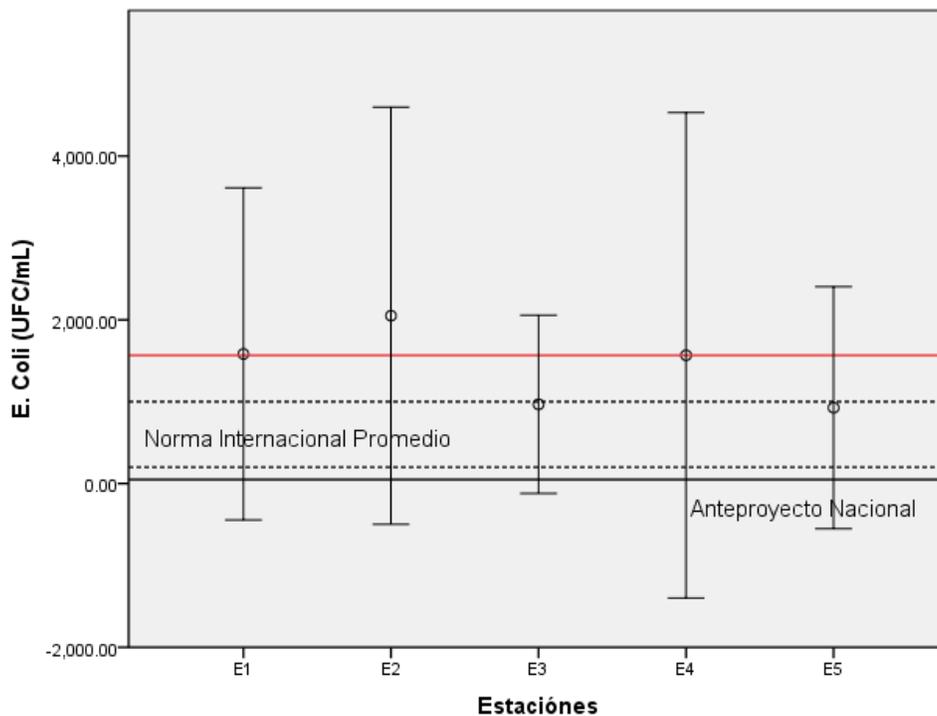


**Figura 2.11. Coliformes Totales en la Bahía de Manzanillo desde enero 2011 a febrero 2013. (--- media de los valores de coliformes totales)**

Si se comparan los valores de Coliformes Totales obtenidos en la Bahía de Manzanillo, con respecto al promedio de las Normas Internacionales (Tabla 2.10) se puede observar que el promedio de los valores de los puntos se encuentra por debajo; sin embargo, en puntos como el E4, se puede observar variaciones muy extremas con valores máximos de 8700 UFC/mL, lo cual se encuentra aproximadamente 3000 unidades por encima de la Norma.

Estas condiciones son atribuibles a que los asentamientos humanos en esas zonas por lo general no cuentan con plantas de tratamiento de aguas residuales, y éstas se vierten directamente al mar, indicando que el desarrollo urbano más el turismo intervienen como fuente de contaminación de estas áreas.

Se observa una relación directamente proporcional, entre los Coliformes Totales y *Escherichia coli*, lo cual indicaría el aporte importante de aguas con características domésticas; sin embargo, en la época seca, el comportamiento no es tan proporcional, lo cual podría indicar que otras fuentes, como por ejemplo los residuos de lastre o sentina de los barcos con otros contaminantes y tipos de microorganismos, pueden estar aportando a la calidad de agua de la Bahía de Manzanillo.



**Figura 2.12. *Escherichia coli* en la Bahía de Manzanillo desde enero 2011 a febrero 2013. (--- media de los valores de *Escherichia coli*)**

En la E1 se observa un aumento en la cantidad de los *Escherichia coli*, probablemente, debido al cese de las lluvias y a un aumento en la llegada embarcaciones a la bahía y al puerto, como se observa en la Figura 6.12, en los punto E1, E2 y E4 los valores promedio y máximo se encuentran por encima del promedio de los valores de las Normas Internacionales y del Anteproyecto de Norma. En el caso de los puntos E3 y E5, el promedio se encuentra cumpliendo con las Normas.

El valor máximo de  $DBO_5$  se dio en la E1 en la época seca mientras que el valor mínimo de *Escherichia coli* se dio en este mismo punto en la misma época, esto parece contradictorio, ya que a una mayor  $DBO_5$  debe existir una mayor cantidad de microorganismos, ya que la *Escherichia coli* es solo una parte de los microorganismos fecales (Corro y Huertas, 2011), presumiblemente se puede dar este resultado debido a que este punto se encuentra alejado de la desembocadura del Folk River, que es el río que lleva una mayor cantidad de microorganismos de *Escherichia coli* producido por la población y los animales (Grey, 2007).

#### 2.4.3.1. Índice de Calidad Fisicoquímico y Microbiológicos del agua marina (CIAM)

La aplicación del Índice de Calidad del Agua (ICA), es una metodología que aporta información reproducible sobre los atributos del agua y, una alternativa para dictaminar un cuerpo de agua sin recurrir a recopilaciones estadísticas de las tendencias, variable por variable y sitio por sitio, utilizado con mayor regularidad en el caso de aguas continentales (Pérez A. y Rodríguez A., 2007).

Las variables para el Índice de Calidad Fisicoquímico y Microbiológicos del Agua Marino Costero (CIAM) se escogieron considerando como prioridad el uso para sostenimiento de la biodiversidad y el desarrollo de la vida acuática en el cuerpo de agua (Rickert 1993) y como ecosistema meta, y zonas marino costeras.

Además del ICA general, es posible calcular los valores del CIAM para las categorías siguientes:

1. Materia orgánica,
2. Bacteriológico,
3. Material iónico,
4. Material en suspensión, y
5. Nutrientes.

Para la obtención de estos índices se utiliza la misma fórmula de ICA general (promedios ponderados), y los coeficientes correspondientes para cada parámetro. Posteriormente se hicieron los diagramas de dispersión de cada una de las variables estudiadas, su relación con el CIAM y se identificaron los patrones de comportamiento donde se obtuvieron los modelos matemáticos, permitiendo efectuar pronósticos sobre el avance del nivel de contaminación de una manera rápida, segura y sencilla en diferentes tiempos.

Para determinar los indicadores adecuados, se tuvo en cuenta un número de actividades específicas que realiza cada puerto objeto de este estudio. Un CIAM es un número adimensional, comprendido entre 1-100, donde a mayor valor mejor es la calidad del recurso (Tabla 2.11). Así, agua altamente contaminada tendrá un  $CIAM \approx 0 \%$ , en tanto que el agua en excelentes condiciones el valor del  $CIAM \approx 100\%$ .

El CIAM fue desarrollado de acuerdo con las siguientes etapas, la primera etapa consistió en crear una escala de calificación de acuerdo con los diferentes usos del agua, y la segunda involucró el desarrollo de una escala de calificación para cada indicador, de tal forma que se estableciera una correlación entre los diferentes parámetros y su influencia en el grado de contaminación.

El CIAM para la Bahía de Manzanillo se estimó mediante la linealización de valores extremos de la Ecuación 1.1:

$$CIAM = 100 - C_i * [(P_i/P) - 1] \quad \text{Ecuación 1.1}$$

Donde:  $C_i$  es el ponderador de cada parámetro,  $P_i$  es el valor medido de cada parámetro y  $P$  es el valor ideal de cada parámetro para que la calidad del agua sea óptima. Los valores resultantes del cálculo en el corchete “ $[(P_i/P) - 1]$ ” representan el desalineamiento de la muestra respecto a un valor óptimo de cada parámetro, donde valores cercanos a 10 representan altos niveles de calidad del

agua. De este índice calculado como valor intermedio para la determinación del CIAM, se procede a tomar los valores extremos (mínimo y máximo) para ser linealizados en una escala de 0 a 100 que finalmente corresponderá a la asignación de cada valor del CIAM y su consecuente clasificación.

La relación entre el CIAM y la calidad del agua de la Bahía de Manzanillo para el sostenimiento de la vida acuática, se resume en la Tabla 2.11, que es una modificación de la propuesta de House (1990).

**Tabla 2.11. Escala de valores del CIAM y su relación con la calidad del agua para la vida acuática**

<b>VALORES DE CIAM</b>	<b>CALIDAD DEL AGUA</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
Entre 85 y 100	Excelente	No presenta peligros para el ecosistema. Es adecuada para el desarrollo de todas las especies.
Entre 70 y 84	Buena	Sostiene una alta biodiversidad de vida acuática. Se presentan períodos donde algún indicador muestra peligros para el ecosistema.
Entre 50 y 69	Regular	Existen signos de contaminación, como aumento en la concentración de nutrimentos.
Entre 25 y 49	Mala	Manifiesta problemas con fuentes de contaminación puntuales y no puntuales.
Entre 0 y 24	Pésima	Posibilita el crecimiento de poblaciones elevadas de un limitado número de organismos resistentes a aguas muy contaminadas.

Los resultados obtenidos (Tabla 2.12) indicaron que la calidad del agua para todos los usos potenciales se clasificó como de calidad buena representando un promedio de 72 que dentro del CIAM está en el rango entre 70-84 y representa en el 100% de las estaciones muestreadas

**Tabla 2.12. Valores promedio de la concentración media de los parámetros estudiados e índice de calidad integral del agua (CIAM) en sitios de la Bahía de Manzanillo. Periodo 2011-2013**

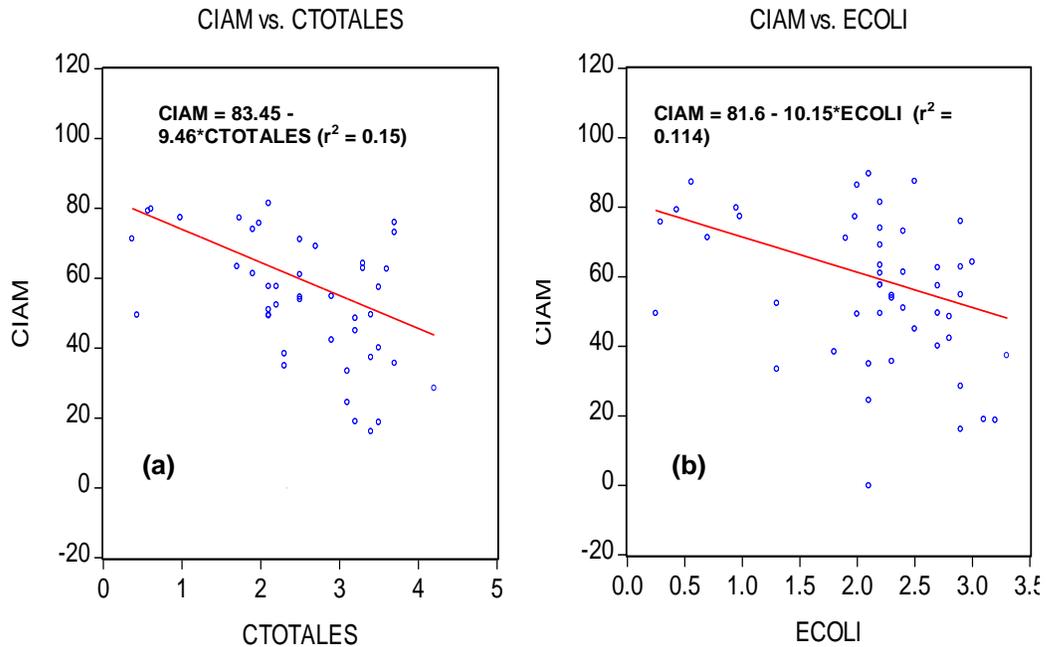
Sitios de muestreos	OD (mg/l)	DBO (mg/l)	pH	Turbidez (NTU)	Temperatura (°C)	Coliformes Totales (X10 <sup>3</sup> UFC/m)	E. Coli (X10 <sup>3</sup> UFC/m)	CIAM
1	7.2	2.8	7.9	4.3	28.7	2.9	1.6	87
2	7.6	1.3	7.8	3.0	28.8	2.8	2.0	73
3	7.2	1.3	8.0	3.2	28.3	1.8	1.0	65
4	7.5	1.3	8.0	3.2	29.0	3.3	1.7	74
5	7.3	1.2	8.0	3.8	29.2	1.4	0.9	63

El 60 % de los sitio de muestreo está en la categoría de buena calidad dentro del intervalo de CIAM = < 70, valores donde presenta excelente calidad del agua es en la Estación 1. Cabe señalar que gran parte de la zona no es apta para consumo ni contacto humano. Esta es la situación para los sitios 2 y 3 presumiblemente producto de las descarga de aguas domésticas y residuales sin tratamiento. Dentro de los parámetros que más influyen en la contaminación de acuerdo con los resultados del análisis están el Oxígeno Disuelto y los Coliformes totales.

#### 2.4.4. *Pronóstico de la calidad integral del agua Marina*

#### **Relación entre CIAM, los coliformes totales y *Escherichia coli***

En el caso de los coliformes totales da como resultado una pendiente negativa donde la relación entre las variables coliforme totales y el CIAM son directo. Esto quiere decir que cuando aumenta el coliforme disminuye el CIAM o empeora la calidad del agua en la zona (Figura 2.13.a).



**Figura 2.13. Correlaciones del CIAM en dependencia (a) Coliformes totales (b) *Escherichia coli* en la Bahía de Manzanillo**

Con relación *Escherichia coli*, se da el mismo efecto que en el caso anterior. La pendiente es negativa y la relación entre las variables da como resultado una disminución del CIAM y un aumento de la *Escherichia coli* (Figura 2.5.b).

Cabe señalar, que en ambos casos la gran nube de puntos representa una dispersión de los valores obtenidos en cada muestreo, sin embargo, la relación que se presenta no es concluyente.

### **Relación entre el CIAM, la DBO y OD**

En el caso de la Demanda Bioquímica de Oxígeno, cuando aumenta el CIAM, disminuye la  $DBO_5$  creando una marcada dispersión en un segmento de la pendiente (Figura 2.14.a).

En el caso del OD, esta relación da como resultado una dispersión de los puntos de muestreos con una pendiente positiva la cual tiene una relación directa con las

variables en función del aumento del oxígeno y la disminución del CIAM (Figura 2.6.b).

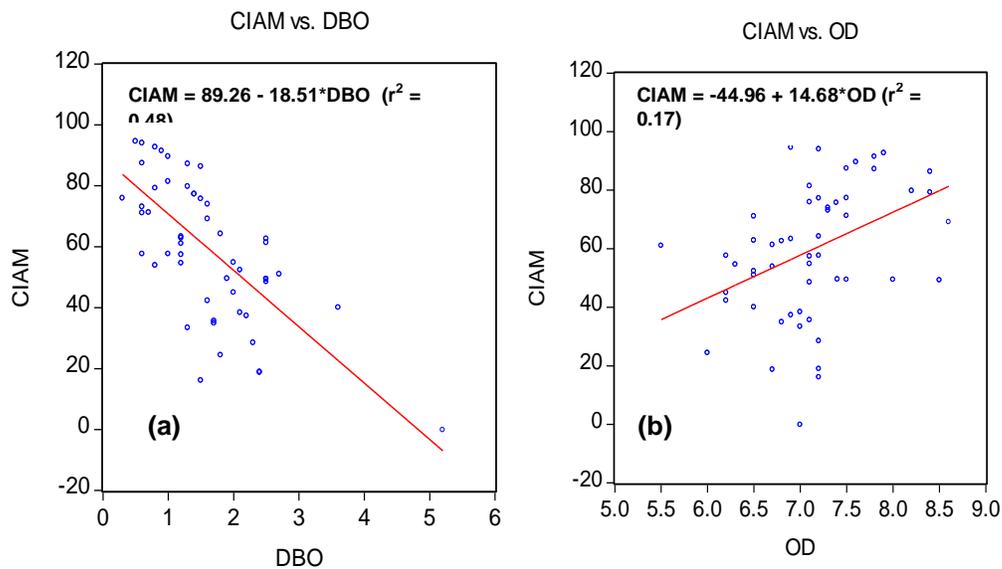


Figura 2.14. Correlaciones del CIAM en dependencia (c) demanda bioquímica de oxígeno, (b) oxígeno disuelto en la Bahía de Manzanillo.

### Relación entre el CIAM y el pH

En esta relación la pendiente es positiva y la misma está orientada a una dispersión completa de puntos siendo no concluyente y a su vez en un aumento del CIAM y una disminución del pH (Figura 2.14).

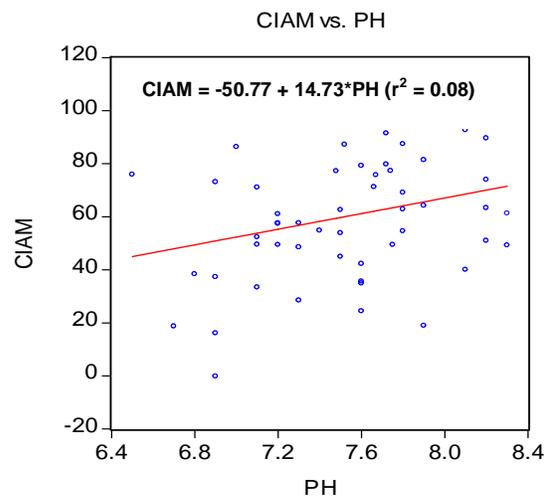
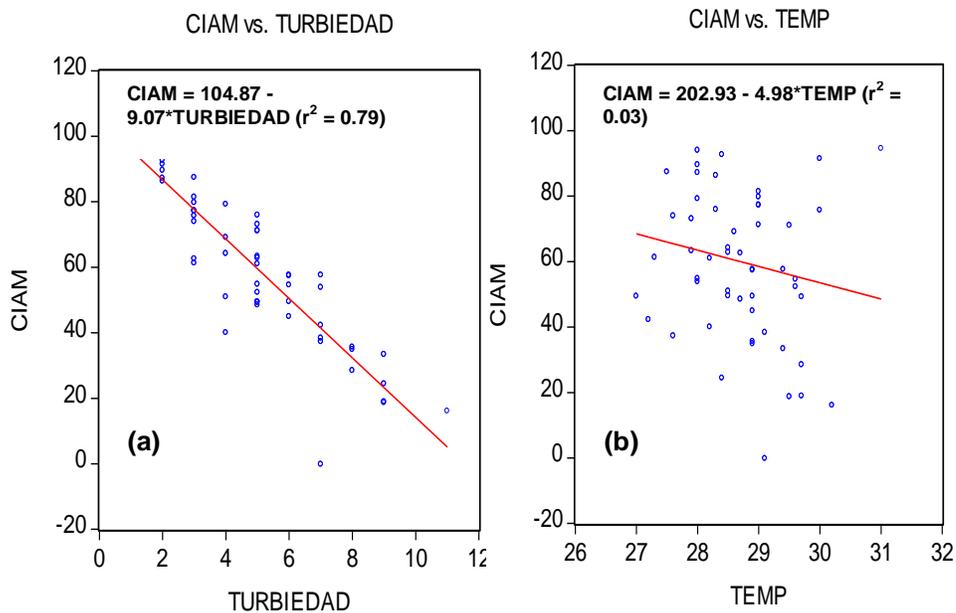


Figura 2.14. Correlaciones del Índice de Calidad de Agua Marina en relación al pH en la Bahía de Manzanillo

## Relación entre el CIAM, la turbiedad y la temperatura

En este estudio, es la que mejor condición presenta por la uniformidad y distribución de los puntos de muestreos a través de la pendiente que da como resultado una pendiente negativa que está en función del aumento del CIAM y la disminución de la turbiedad, a mayor turbiedad menor CIAM (Figura 2.8.a). En caso de la temperatura, esta relación se da como resultado de la dispersión de los puntos de muestreos inmerso en una pendiente negativa que se genera por las condiciones ambientales (Figura 2.15.b).



**Figura 2.15. Correlaciones del Índice de calidad de agua marina en analogía a la (a) turbiedad (b) temperatura en la Bahía de Manzanillo.**

## 2.5. Conclusiones y Recomendaciones

A partir del análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio y su comparación con los escasos estudios y evaluaciones científicas realizadas sobre las aguas marino costeras en Panamá, se puede señalar que a pesar de las causas potenciales de contaminación expuestas a lo largo del estudio, las

condiciones físico-químicas necesarias para mantener la vida acuática en las mismas, se encuentra dentro los rangos aceptables.

La calidad del agua en cada una de las áreas de la Bahía no evidencia graves problemas de contaminación, tanto a nivel de línea costera como en la parte externa de la misma, probablemente por la dinámica de las corrientes y por el poder de dilución y depuración del agua de mar; no obstante, se debe considerar que con el tiempo, y existiendo descargas residuales puntuales y permanentes, en un futuro se podría provocar contaminación.

Después de haber analizado este estudio y haberlo comparado con otros sobre puertos internacionales, el promedio de las Normas Internacionales y el Anteproyecto de Ley de Calidad de las aguas Marinas y Costeras de Panamá, se puede concluir que las aguas de la Bahía de Manzanillo, son aptas para la utilización y desarrollo portuario del país, ya que los valores obtenidos en este estudio se encuentran por debajo de los valores máximos permisibles establecidos, tanto por el promedio de las Normas Internacionales, así como por el Anteproyecto de Ley Marino y Costero de Panamá.

Las variaciones de todos los parámetros, con excepción de la turbiedad, es aproximadamente de 2 unidades, lo cual es bajo. En el caso de la turbiedad la variación es mayor de 2 a 3 veces más que el resto de los parámetros y se da de forma más uniforme, lo que favorece la mejor correlación con el CIAM. Por lo cual se puede concluir que el CIAM es un buen representador de la calidad del agua, al observar que se mantienen los comportamientos ya estudiados de calidad de agua.

El análisis de los resultados sugiere que algunas zonas tales como las adyacentes a las estaciones de muestreos 2 y 3 no son aguas aptas para contacto directo. Es decir, deberán existir restricciones para el desarrollo de actividades de deportes acuáticos, balnearios, y el turismo en general que requiera contacto directo con las

aguas marinas y costeras, lo cual limita las posibilidades de desarrollo económico de estas zonas por la vía del turismo.

Los resultados de este Capítulo, pueden ser considerados como pautas iniciales para que sean tomados en cuenta en lineamientos para establecer un el Sistema Integrado de control de calidad de las aguas en el sector marítimo- portuarios de la Bahía de Manzanillo, resultando una herramienta de gran ayuda en la toma de decisiones y en gestión del entorno marítimo-portuario al permitir entre otras, poner en marcha actuaciones de emergencia y las correspondientes los Planes de Contingencia.

## **2.6. Referencias Bibliográficas**

[1] AHUMADA, R., [1995]. Bahías: áreas de uso múltiple un enfoque holístico del problema de la contaminación. Ciencia y Tecnología del Mar, Número Especial: 59-68.

[2] ALBAIGÉS, J., [2007]. Contaminación por vertidos de hidrocarburos al medio ambiente marino. ¿Qué aprendimos de la catástrofe del Prestige?. Universidad Internacional Menéndez Pelayo, Coruña 183-199.

[3] AKPA, E. y OFFEM, J., [1993]. Seasonal variation in water quality of the Cross River, Nigeria. Rev. Hydrobiol. Trop. 26: 95-103.

[4] APHA, [1995]. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19<sup>th</sup> ed. American Public Health Association. Washington, DC, EEUU. 112 pp.

[5] ATLAS, R. y BARTHA, R. [2002]. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Segunda edición. Editorial Addison Wesley. Madrid, España. 217-218.

[6] BAIN, M. y N. STEVENSON, [1999]. A quatic Habitat Assessment Common Methods. American Fisheries Society. Bethesda EE.UU.

[7] CARUSO, G., CRISAFI, E. y MANCUSO, M., [2002]. Development of an enzyme assay for rapid assessment of *Escherichia coli* in seawaters. J. Appl. Microbiol. 93: 548-556.

[8] CASADO-MARTÍNEZ, M., FORJA, J. y DELVALLS, T., [2007]. Direct comparison of amphipod sensitivities to dredge sediments from Spain ports. Chemosphere 68: 677-685.

[9] COLOMA, B., [2010]. Estudio de Impacto Ambiental del Puerto Marítimo de Guayaquil Libertador Simón Bolívar.

[10] CORBIT, J., [2003]. Manual Ambiental de Referencia de la Ingeniería Ambiental. Mc Graw – Hill. España.

[11] CORRO, J. Y HUERTAS, R., [2011]. Comparación de la Calidad de Agua en Puertos y Mecanismos para la Prevención y Control de su Contaminación. Universidad Tecnológica de Panamá. Tesis.

[12] CHAPMAN, D. y V. KIMTSACH., [1992]. Selection of water quality variables. En: D. Chapman (ed.). Water quality assessments. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, World Health Organization, United Nations Environment Programme, E & FN Spon, Londres. Pp. 59-126.

[13] Decreto Supremo N° 046-93-EM. Reglamento para la Protección Ambiental en las Actividades de Hidrocarburos.

[14] DUBLIN-GREEN, C., [1992]. Seasonal and spatial variations in some physico-chemical parameters of Bonny River (Nigery Delta). *Acta Hidrobiol.* 34: 3-17.

[15] FUJIOKA, R., [2002]. Indicators of marine recreational water quality. En Hurst C. J., Knudsen G. R., McInerney M. J., Stetzenbach L. D., Walter M. V. (Eds.). *Manual of Environmental Microbiology*. 2<sup>da</sup> ed. ASM. Washington, D. C., EEUU. pp: 234-243.

[16] GONZÁLEZ, M., MÉNDEZ, L., LÓPEZ, D. y VÁZQUEZ. A., [2006]. Evaluación de la Contaminación en Sedimentos del Área Portuaria y Zona Costera de Salina Cruz, Oaxaca, México. *INCI*, sep. 2006, vol.31, no.9, p.647-656. ISSN 0378-1844.

[17] GREY, A.; DOMINGUEZ, V.; y CASTILLERO M., [2014]. Determinación de Indicadores Físicos, Químicos y Microbiológicos de Calidad del Agua Superficial en la Bahía de Manzanillo. *Revista I+D Tecnológico* 10.1.

[18] GREY, A., [2007]. Estudio Comparativo de la Calidad de las Aguas Costeras Durante el Periodo Seco y Lluvioso en la Bahía de Manzanillo en la Ciudad de Colón, Universidad Tecnológica de Panamá, Panamá.

[19] HIGUERA, K. y WONG, S., [2009]. "Caracterización De Las Aguas Oleosas Procedentes De Las Sentinas Carga General y su Efecto al Medio Ambiente. Universidad Tecnológica de Panamá, Panamá.

[20] HOUSE, M. H., [1990]. Water quality indices as indicators of ecosystem change. *Environ. Monit. Assess.* 15: 255-263.

[21] KIELY, G., [1999]. Ingeniería Ambiental: Fundamentos, Entornos, Tecnologías y Sistemas de Gestión. 1era Edición. España, Mc Graw – Hill / Interamericana de España.

[22] LANDAETA, J., [2001]. Potenciales Impactos Ambientales Generados por el Dragado y la Descarga del Material Dragado. Instituto Nacional de Canalizaciones. Dirección de proyectos e investigación, Caracas, Venezuela.

[23] LINDIG, Cisneros R. y L. ZAMBRANO. [2007]. Aplicaciones prácticas para la conservación y restauración de humedales y otros ecosistemas acuáticos. Perspectivas sobre la conservación de ecosistemas acuáticos en México. Instituto Nacional de Ecología-Semarnat, U. S. Fish & Wildlife Service, Unidos para la Conservación. México. pp. 167-188

[24] LÓPEZ, J., [2002]. Caracterización Bacteriológica y fisicoquímica del agua de la zona marino costera de la playa Moreno, Municipio de Maneiro. Universidad de oriente. Boca del Río. Venezuela. 122 pp. 2002.

[25] MÁRQUEZ, C., [1999]. Condición ambiental y calidad del agua de la Ensenada Grande del Obispo en el perfil longitudinal O-E. Trabajo de Pregrado. Departamento de Química. Universidad de Oriente, Cumaná.

[26] MATA, J., [2011]. Variación temporal del contenido de metales trazas en el molusco Arca zebra, agua y sedimentos superficiales, extraídos del banco natural Coche-Chacopata, estado Sucre. Trabajo de Pregrado. Departamento de Química. Universidad de Oriente, Cumaná.

[27] MAYS, L. W., [1996]. Water Resources Handbooks. Estados Unidos de América, Mc Graw – Hill.

[28] MCCREADY, S., SPYRAKIS, C., GREELY, G., BIRCH y LONG E., [2003]. Toxicity of surficial sediments from Sydney Harbour and Vicinity, Australia. *Environmental Monitoring and Assessment* 96(1-3): 53-83.

[29] MIHELICIC, J. R., [2001]. *Fundamentos de Ingeniería Ambiental*. Limusa Wiley. México D.F.

[30] MONTALVO, J.; GARCÍA, L.; LOZA, S.; ESPONDA, S.; CESAR, M.; GONZÁLES, R. y HERNÁNDEZ., [2008]. *Oxígeno Disuelto y Materia Orgánica en Cuerpos de Aguas Interiores del Archipiélago Sabana-Camagüey, Cuba*. Serie Oceanográfica N.1, ISSN 2072 – 800X. Cuba.

[31] MONTALVO, J. y PERIGO, E., [2000]. *Prospección de variables hidroquímicas de calidad ambiental en la zona litoral entre el Río Hatiguanico y Majana. Costa sur Occidental. Contribución a la Educación y la protección Ambiental V(I). VI Taller*. 2000. Editorial Academia.

[32] MOTA, Jorge., [2004]. *Desarrollo de una Red Neuronal para Estimar el Oxígeno Disuelto en el Agua a partir de Instrumentación de e.d.a.r.*

[33] NEIDHARDT, F.C., [1999]. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular Biology*. 2<sup>da</sup> Edition. Washington, ASM Press.

[34] OLSON, B., [1978]. *Enhanced accuracy of coliform testing in seawater by a modification of the Most Probable Number method*. *Appl. Env. Microbiol.* 36: 438-444.

[35] Panamá, [2006]. *Anteproyecto de Normas de Calidad de Aguas Marinas y Costeras*.

[36] PÉREZ, A. y RODRÍGUEZ, A., [2007]. Índice fisicoquímico de la calidad de agua para el manejo de lagunas tropicales de inundación. *Revista de Biología Tropical*, vol. 56, núm. 4, diciembre, 2008, pp. 1905-1918 Universidad de Costa Rica San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica.

[37] RICKERT, D., [1993]. Evaluación de la calidad del agua para determinar la naturaleza y el grado de contaminación del agua por la agricultura y actividades afines, p.187-209. *In* Prevención de la contaminación del agua por la agricultura y actividades afines. FAO, Santiago de Chile, Chile. 385 p.

[38] RIVERA, N., ENCINA F., MUÑOZ-Pedrerros, A. y MEJIAS, P., [2004]. La Calidad de las Aguas en los Ríos Cautín e Imperial, IX Región-Chile. *Información Tecnológica*. Vol. 15.

[39] RODRÍGUEZ-Ángeles, G., [2002]. Principales Características y Diagnóstico de los Grupos Patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México / vol.44, no.5, septiembre-octubre*.

[40] RUDOLPH, A., AHUMADA, R. y PÉREZ, C., [2002]. Dissolved oxygen content as an index of water quality in San Vicente Bay, Chile (36°45'S). *Environmental Monitoring and Assessment* 78: 89.

[41] SAWYER, C., MCCARTY, P. y PARKIN, G., [2001]. *Química para Ingeniería Ambiental*. 4a. edición. Bogotá, Colombia, Mc Graw – Hill.

[42] SEISDEDDO, M., [2007]. Caracterización fisicoquímica de las aguas del litoral oriental de la provincia de Cienfuegos. Cuba.

[43] SHIARIS, M., REX, C., PETTIBONE, G., KEAY, K., MCMANUS, P., REX, M. y GALLAGHER, E., [1987]. Distribution of indicator bacteria and *Vibrio*

parahaemolyticus in sewage-polluted intertidal sediments. Applied and Environmental Microbiology, 53(8), 1756–1761.

[44] SPROVIERI M., FEO, M., PREVEDELLO, L., MANTA, M., SAMMARTINO, S., TAMBURRINO, S. y E. MARSELLA., [2007]. Heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in surface sediments of the Naples harbour (southern Italy). Chemosphere 67: 998-1009.

[45] Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, [2005]. <http://www.standardmethods.org>

[46] TIN, J., VAN LOON, G. y DUFFY, S., [2005]. Environmental chemistry. A global perspective. 2da. Edition, 456 pp.

[47] URS Holdings, Inc., [2005]. Estudio Científico y Técnico, Aguas Marinas y Costeras. Enero de 2005.

[48] VILLARREAL, A., [2009]. Análisis de las Variables Físicoquímicos y Biológicas del río Portugal de Piedra, Alto Cauca, Colombia.

### ***Capítulo III***

**Caracterización y Análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en los sedimentos marinos de la Bahía Manzanillo y su influencia en los procesos de biodegradación.**

### **3. Caracterización y Análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos de sedimentos en la Bahía de Manzanillo**

#### **3.1. Introducción**

En los ecosistemas acuáticos, los sedimentos juegan un papel importante en la degradación de la materia orgánica y el reciclamiento de los nutrientes Hopkinson *et al.* (1999). Revhsbech *et al.* (1980) y Mackin y Swider (1989), concluyen que en los sedimentos marinos costeros la penetración de oxígeno y los procesos de descomposición aeróbicos están limitados a unos pocos milímetros de la capa superficial, y por debajo de esta zona óxica la descomposición de la materia orgánica ocurre por medio de una gran variedad de procesos anaeróbicos.

La determinación de hidrocarburos es de gran importancia para las entidades ambientales, debido a los deterioros que causan éstos al ambiente. Entre los múltiples factores que afectan el ambiente están los derramamientos, vertimientos de residuos industriales en ríos, mares y otras fuentes (Santa *et al.*, 2002). La presencia de aceites y grasas en aguas residuales domésticas e industriales es de interés público debido tanto a su efecto perjudicial en lo estético, como al impacto negativo que provoca en la vida acuática. Parámetros reglamentarios y normativos se han establecido para su monitoreo en agua y en efluentes, los cuales requieren una adecuada metodología para el aseguramiento de la calidad analítica de los resultados (Días *et al.*, 2001 y Bonert *et al.*, 2006).

##### **3.1.1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)**

Los HAP son un grupo de compuestos orgánicos que consisten en moléculas con dos o más anillos aromáticos fusionados, alto grado de insaturación, y gran cantidad de electrones deslocalizados (Ping y Panuwat, 2006). Dependiendo de su carácter aromático, absorben la luz ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico. Son solubles en muchos disolventes orgánicos, pero

prácticamente insolubles en agua, tanto menos cuanto mayor sea su masa molar (Stellman y McCan, 1998).

Los HAP se originan de la combustión incompleta o pirólisis de la materia orgánica, por la actividad natural o antropogénica (Peña *et al.*, 2003). Así, son fuentes principales de emisión de HAP, los automóviles, los aviones, los barcos, las plantas de generación de energía eléctrica y las incineradoras de residuos, las calefacciones de los edificios, los incendios forestales y el humo del tabaco, así como los alimentos ahumados, a la parrilla o a la barbacoa. En general, la tasa de formación de estos compuestos depende de las condiciones de combustión. Una combustión que genera mucho humo negro dará lugar a una mayor cantidad de estos hidrocarburos por masa de compuesto quemado (Vives *et al.*, 2001).

Aquellos que no son degradados son transferidos a aguas superficiales, suelos o sedimentos por deposición húmeda o seca, y allí serán más susceptibles a la degradación los HAP más ligeros. Generalmente, mientras más anillos bencénicos presente la molécula, menor la solubilidad, movilidad y degradación; y mayor la adsorción, acumulación y persistencia en el ambiente (Cram *et al.*, 2004).

Dentro de los ambientes acuáticos los HAP sufren una serie de procesos de intemperización (físicos, químicos y biológicos), tales como evaporación, oxidación fotoquímica, degradación microbiana, dispersión y disolución en el agua, de esta forma se asocian fácilmente con la materia particulada y finalmente se depositan en el sedimento. A través del agua, de los sedimentos o del material suspendido, los organismos marinos son expuestos a los HAP (Peña *et al.*, 2003).

#### 3.1.1.1. Hidrocarburos en sedimentos

Los procesos físicos, químicos y biológicos contribuyen considerablemente al destino de los hidrocarburos cuando se derraman o vierten en áreas costeras. Después de una rápida evaporación y de la pérdida de las fracciones ligeras, en

su mayor parte el hidrocarburo permanece en la columna de agua o en sedimentos, sujeto a degradación microbiana y a otros procesos, en general lentos. Por consecuencia, y con la ayuda de procesos sedimentarios, casi todos los hidrocarburos tienen como destino final los sedimentos. Este fenómeno es más agudo en los estuarios y otras áreas someras, donde es baja la acción de las olas y, en cambio, es alta la tasa de sedimentación (Alemán, 2009).

El analizar los sedimentos provee muchas ventajas, entre las cuales se puede mencionar: la concentración de contaminantes por largos periodos de tiempos y más extensos que los organismos; mucho más fácil de analizar que la biota, hábitats de diversos organismos que representa en muchos sistemas la base de la cadena alimenticia, fáciles de obtener y recolectar como también la repetición de los análisis en los sitios de interés. Adicional, pueden aportar información de interés sobre áreas contaminadas y brindar datos del estado previo a un evento antropogénico dando así los registros de compuestos de interés y de la viabilidad de las condiciones ambientales (Igarza, 2012; Bonilla *et al.*, 2001).

### 3.1.2. *Propiedades Físicas y Químicas*

Los HAP están formados por dos o más anillos de bencenos fusionados, los cuales difieren en el número y posición del anillo aromático. Hay dos clases de hidrocarburos aromáticos: los de bajo peso molecular que tienen de 2 a 3 anillos aromáticos como el naftaleno, fluoreno, fenantreno y antraceno y derivados, y los de alto peso molecular que tienen 4 a 7 anillos aromáticos como el criseno. Sus características físicas y químicas varían de acuerdo a su peso molecular y, en consecuencia, en su distribución y conducta hacia el ambiente, lo mismo que sus efectos en los sistemas biológicos (Lesser, 1995).

Debido a su naturaleza hidrofóbica, los HAP en los ecosistemas terrestres y acuáticos se encuentran en suelos y sedimentos, por lo que presentan una baja

solubilidad biológica y por lo tanto son bioacumulados en la cadena alimentaria (Morehed *et al.*, 1986)

Su importancia está relacionada a su movilidad, debido a su peso molecular, donde los de alto peso son relativamente inmóviles y por ende, de baja solubilidad y volatilidad. Dieciséis HAP son considerados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (EPA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Comunidad Económica Europea (CEE) debido a sus efectos carcinógenos (Menzie *et al.*, 1992), motivo por el cual se toman como referencias para este estudio tres HAP de bajo, medio y mayor peso molecular; los mismos son el Naftaleno (128, 18 g/mol), Fenantreno (178,23 g/mol) y Pireno (202,26 g/mol).

#### 3.1.2.1. Naftaleno

El naftaleno (Figura 3.1) es el más sencillo de los HAP y es el primer miembro del grupo de 16 considerado por la USEPA como contaminantes prioritarios (Cram *et al.*, 2004). Este es usado como material de partida para la síntesis orgánica de una amplia gama de sustancias químicas, como antipolillas, y en conservantes de madera (Stellman y McCan, 1998). La principal fuente de liberación del naftaleno al ambiente es la incineración doméstica de madera y combustibles fósiles. En segundo lugar está el uso de repelentes para polillas. Sólo aproximadamente el diez (10%) del naftaleno que entra al ambiente proviene de la producción y destilación del petróleo, mientras que menos del 1% presente en la atmósfera proviene de la liberación durante su producción (ATSRD, 2005).

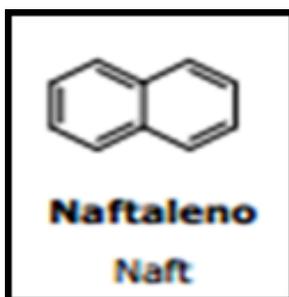


Figura 3.1. Estructura molecular del naftaleno.

El naftaleno es adsorbido de forma moderada (10%) por el suelo y los sedimentos. El grado de adsorción depende del contenido de carbono orgánico en el mismo, esperándose una mayor movilidad en suelos arenosos. El naftaleno que se encuentra cerca de la superficie del suelo se evaporará al aire mientras que algunos microorganismos presentes en el mismo degradarán la mayor parte del naftaleno en 1 a 3 meses (ATSRD, 2005).

### 3.1.2.2. Fenantreno

El fenantreno es un hidrocarburo que presenta tres anillos bencénicos fusionados (Figura 3.2). No es mutagénico o carcinogénico para los humanos; sin embargo, se ha demostrado que es tóxico para los organismos acuáticos. El fenantreno suele usarse como compuesto modelo para el estudio de la biodegradación de los HAP, dado que se encuentra en altas concentraciones en las muestras ambientales (Herrera *et al.*, 2008).



Figura 3.2. Estructura molecular del fenantreno.

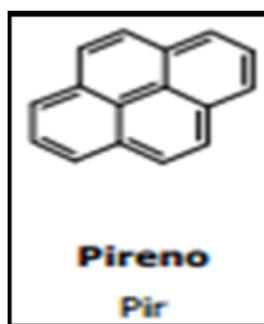
La presencia de fenantreno en los ecosistemas se debe a la combustión incompleta de materiales orgánicos como carbón, petróleo, gasolina y madera. Una mínima porción es derivada de incendios forestales y erupciones volcánicas. Las fuentes antropogénicas de contaminación de ambientes acuáticos con fenantreno son los derrames de petróleo crudo o refinado, efluentes industriales o domésticos, suelo acarreado por erosión hídrica y deposición directa desde la atmósfera (Castro *et al.*, 2008). El fenantreno, al igual que otros contaminantes

pueden ser asimilados por las raíces de las plantas y acumulados, metabolizados o volatilizados (Reynolds y Skipper, 2005).

Aunque el fenantreno no ha sido clasificado como cancerígeno o mutagénico, sí se ha demostrado que es tóxico para algunas especies marinas. La concentración letal de fenantreno reportada para una microcrustácea es de 0.245 mg/L (Traczewska, 2000).

### 3.1.2.3. *Pireno*

El pireno (Figura 3.3) es un HAP que posee 4 anillos bencénicos, por este motivo entra en la clasificación de HAP de alta masa molecular. No tiene actividad cancerígena, pero sus derivados benzo[a]pireno y dibenzopireno son cancerígenos muy potentes (Stellman y McCan, 1998).



**Figura 3.3. Estructura molecular del pireno.**

Al liberarse el pireno al medio ambiente puede encontrarse en muchos lugares, ya que este es un producto ubicuo de combustión incompleta. En gran parte está asociado con la material particulado, suelos y sedimentos. Aunque las concentraciones suelen ser más altas en los sitios cercanos a la fuente de emisión, su presencia en sitios distantes de fuentes primarias indica que es razonablemente estable en la atmósfera y capaz de transportarse a largas distancias (Irwin, 1997).

## **3.2. Objetivos**

Determinar la presencia de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en los sedimentos marinos de la Bahía Manzanillo y su influencia en los procesos de biodegradación.

## **3.3. Materiales y métodos**

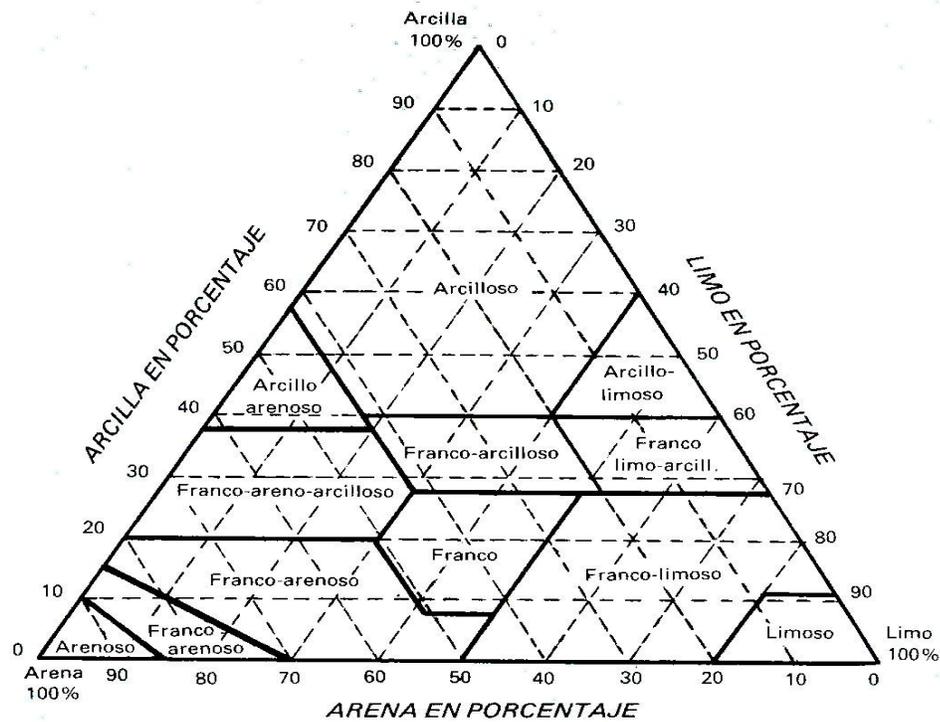
### *3.3.1. Análisis de la Muestra*

El material sólido fresco se preservó en botellas ámbar y se refrigeró a 4°C hasta su análisis. La porción de sedimento para los análisis geoquímicos se secó por 72 horas a -50°C.

#### *3.3.1.1. Textura*

Para el análisis granulométrico de las diferentes fracciones, fueron tomados 50 g del sedimento seco y previamente pasados por un tamiz de 2mm. Se colocaron en la copa de una batidora, más de 10 ml de la solución dispersante (polifosfato de sodio), agua destilada, y se agitaron durante 5 min. Luego fueron transferidos a una probeta de un litro, completados con agua destilada y agitados para homogeneizar el contenido. Se dejó la probeta sobre el mesón, se activó un cronómetro y se introdujo un densímetro Bouyoucos. A los 40 s del cese de la agitación fue tomada la medida del densímetro y la temperatura de la solución. Después de dejar pasar 120 min, se introdujo nuevamente el densímetro y fue tomada la temperatura.

Una vez conocidos los valores fueron introducidos en las formulas señaladas por Primo y Carrasco (1973), para así conocer los porcentajes de arena, limo y arcilla. (Tabla 3.1.)



**Figura 3.4. Triángulo de Sheppard**

Mientras que la textura de los sedimentos se determinó según el triángulo de Sheppard (1954). La Figura 3.4 muestra el esquema del Triángulo de Sheppard. Los porcentajes de arcilla, limo y arena fueron calculados de las lecturas del densímetro, utilizando las siguientes ecuaciones:

$$x = \frac{c + (t - 20)0,36}{50} \cdot 100 \quad \text{(Ecuación 3.1)}$$

$$y = \frac{c' + (t' - 20)0,36}{50} \cdot 100 \quad \text{(Ecuación 3.2)}$$

Dónde:

x = porcentaje de limo + arcilla

Arcilla= x – porcentaje de limo

$(x - y)$  = porcentaje de limo

$(100 - x)$  = porcentaje de arena

0,36 = factor de corrección por grado de diferencia de temperatura

**Tabla 3.1. Clasificación de las partículas del suelo**

TIPOS DE PARTÍCULA		SISTEMA AMERICANO (mm)	SISTEMA INTERNACIONAL (mm)
Arena	Arena muy gruesa	2.00 – 1.00	-----
	Arena gruesa	1.00 – 0.50	2.00 – 0.20
	Arena media	0.50 – 0.25	-----
	Arena fina	0.25 – 0.10	0.20 – 0.02
	Arena muy fina	0.10 - 0.05	-----
Limo		0.05 – 0.002	0.02 – 0.002
Arcilla		< 0.002	< 0.002

**Fuente: Calva (2006)**

### 3.3.1.2. *Contenido de Materia Orgánica*

El papel que juega el sedimento en el medio acuático es de primordial importancia, ya que es reflejo de lo que sucede en la columna de agua; en épocas de gran florecimiento el aporte de materiales orgánicos a la fase sedimentaria es mayor y dadas las características diagenéticas y geológicas de cada región, como tasas de sedimentación y velocidades de degradación (La Manna, 2007), se proporcionan materiales remineralizados para los consumidores primarios y alimentación para los consumidores bénticos, algunos de ellos de importancia comercial.

Dicha materia orgánica es la fuente de energía del sistema sedimentario y en donde los agentes biológicos son los principales factores de los cambios diagenéticos, lo que lleva a una transformación de materiales tanto en su composición como en sus propiedades físicas químicas (Strakhov, 1960, y Bordovskiy, 1965).

El contenido de materia orgánica en el sedimento se estableció como porcentaje de materia orgánica en el peso seco del mismo (Tabla 3.2). Para ello, se pesó una cantidad inicial de sedimento (P1), la cual fue secada en una mufla a temperatura entre 103 – 105 °C, enfriados en el desecador por una hora, y pesados nuevamente (P2). Luego se calcinaron en la mufla a 503 °C, se enfriaron y pesaron (P3) (Ramírez y Noreña, 2004). El porcentaje de materia orgánica (%M:O:PS) en P1 se obtuvo mediante la ecuación:

$$\%M:O:PS = 100(P2-P3)/P2. \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

**Tabla 3.2. Valores relativos en porcentajes de materia orgánica**

<b>CATEGORIA</b>	<b>VALOR</b>
Extremadamente pobre	< 0.6
Pobre	0.6 – 1.2
Pobre intermedio	1.3 – 1.8
Medio	1.9 – 2.4
Rico moderadamente	2.5 – 5.0
Rico	5.1 – 14.0
Extremadamente rico	> 14.0

**Fuente: Huertas (2010)**

En el caso de los sedimentos marinos, los contenidos de materia orgánica varían entre 0,5 y 10%. Sin embargo, en condiciones reductoras en el fondo o cuencas semicerradas con escasa circulación del agua, se pueden encontrar valores superiores al 10%. (Guiñez *et al.*, 2010; Silva, 2006).

El 80% de la materia orgánica, en zonas costeras y deltaicas está preservada en los sedimentos limosos y arcillosos, sugiriendo que es fácilmente adsorbida en el material fino de origen terrestre e indicando una zonación circuncontinental (Hedges, 1992).

### 3.3.1.3. Extracción de los HAP

Existen una amplia variedad de técnicas de extracción utilizadas para extraer hidrocarburos de muestras de suelos y sedimentos (Tabla 3.3). Los procedimientos tradicionales de extracción incluyen: Soxhlet, ultrasonidos, agitación mecánica, reflujo con solución metanólica de KOH y la destilación por vapor. Las técnicas modernas incluyen la extracción por fluidos supercríticos, la extracción de líquidos a presión y la asistida por microondas. Cada una técnica tiene sus propios méritos y la elección de la extracción depende de varios factores, entre ellos el costo de capital, gastos por operación, simplicidad de funcionamiento, cantidad de disolventes orgánicos requerida, rendimiento de la muestra y la habilidad de estandarizar el método (Banjoo y Nelson, 2005).

**Tabla 3.3. Extracción de Hidrocarburos y compuestos derivados del petróleo**

SISTEMA DE EXTRACCIÓN	EXTRACTANTE	TIEMPO (h)	TIPO DE ESTUDIO	REFERENCIA
Soxhlet	Diclorometano	24	Biorremediación	Stephens, et al., 1999
Agitación Mecánica	Diclorometano	0.50	Biodegradación	Harris et al., 2002
Soxhlet	Diclorometano:metanol (2:1)	8	Identificación de compuesto	Ortiz y García, 2003
Agitación mecánica	Acetona:diclorometano (1:1)	0.50	Biodegradación	Vallejos et al., 2005
Soxhlet	Diclorometano	8	Evaluación de suelos contaminados	Rivera-Cruz et al., 2005
Soxhlet	Hexano	4	Análisis de HTP	Duran y contreras, 2006
Soxhlet	Hexano	4	HTP en sedimentos	Fernández et al., 2006
Agitación mecánica	Diclorometano	0.50	Fitorremediación	Sangabriel et al., 2006
Soxhlet	Hexano	8	Análisis de HTP	Villalobos et al., 2008
Ultrasonido	Hexano	0.42	Análisis de HTP	Villalobos et al., 2008
Soxhlet	Diclorometano	8	Biodegradación	Lu et al., 2009

La extracción Soxhlet es el método más comúnmente usado para extraer HAP y es el recomendado por la USEPA, sin embargo, se requieren grandes cantidades de solventes (hasta 150 ml) para ser refluados por la muestra sólida entre 6 y 24 horas y puede degradar a los compuestos térmicamente lábiles (Ping y Panuwat, 2006). En comparación, la extracción por ultrasonido es una técnica eficaz para la extracción de trazas orgánicas de suelos y sedimentos. Los estudios han demostrado que los rendimientos obtenidos para la extracción de hidrocarburos por ultrasonidos son mayores en algunos casos que los obtenidos con otras técnicas de extracción (Banjoo y Nelson, 2005).

Para extraer los hidrocarburos se utiliza el método de reflujo con equipo Soxhlet, tomando como referencia los métodos D5369-93 de la ASTM (2003) y 3540C y 3541 de la US EPA (1996, 1994).

Ping y Panuwat (2006) establecieron que la extracción Soxhlet es el método más comúnmente utilizado para extraer HAP y es el recomendado por la USEPA; sin embargo, requieren grandes cantidades de solventes (hasta 150 ml) para ser refluados por la muestra solididad entre 6 a 10 horas y puede degradar a los compuestos térmicamente lábiles.

La extracción Soxhlet es uno de los métodos más utilizados para la extracción de contaminantes orgánicos en muestras ambientales sólidas (Antizar-Ladislao, 2009; Nieto *et al.*, 2006; Viñas-Diéguez *et al.*, 2002). Sin embargo, está condicionada la elección del disolvente, al tiempo de extracción y tipo de suelo (Pons-Jiménez *et al.*, 2011)

La extracción de hidrocarburos por Soxhlet provee fracciones de C<sub>6</sub> a C<sub>50</sub>. Para la óptima extracción de los compuestos orgánicos, los sólidos deben estar en pequeñas partículas; mientras más pequeñas sean las partículas, más área de superficie y contacto; por consiguiente, mejor extracción. Así, sólido de mayor tamaño deben ser reducidos a pequeñas partículas antes de la extracción. El

desarrollo del método de extracción Soxhlet (Figura 3.5) incluye encontrar un solvente o mezcla de solvente que tenga una alta afinidad por los analitos y una baja afinidad por la matriz de la muestra sólida (Alemán, 2009).



**Figura 3.5. Sistema de Extracción Soxhlet**

El solvente debe tener una alta volatilidad por que debe ser removido al final de la extracción para concentrar el analito de interés. Este método consiste en extraer los hidrocarburos contenidos en el sedimento, mediante la acción de un disolvente organico volátil apropiado, que es reflujaado a través de la muestra varias veces durante un tiempo determinado. El disolvente es evaporado y posteriormente es condensado en un refrigerante, se le hace pasar y se le regresa al origen para ser nuevamente evaporado (Alemán, 2009).

La extracción se lleva a cabo mediante un dispositivo soxhlet (EPA3540C). Se Colocan de 5 a 10 g de suelo seco y finamente molido en un cartucho de celulosa o fibra de vidrio. Adiciona sulfato de sodio anhidro en una relación sedimento:sulfato 1:1 y se mezcla. Se coloca cada cartucho que contiene las

muestras dentro de la columna extractora del sistema Soxhlet. Se adiciona  $125 \pm 5$  ml de diclorometano o hexano en el matraz de bola y colocar suficientes perlas de ebullición para evitar la proyección del solvente al calentarse.

Se ensamblar el equipo Soxhlet e iniciar calentamiento hasta alcanzar una temperatura de  $45^{\circ}\text{C}$ . Mantener el reflujo en estas condiciones durante 8 horas, de tal manera que se efectúen entre 6 y 8 reflujos por hora, lo que permitirá la liberación de los analitos. Después de 8 horas, el extracto orgánico contendrá todos los hidrocarburos solubles en diclorometano o hexano. Pasar el matraz bola a un rotoevaporador y concentrar el extracto orgánico a sequedad. Recuperar el concentrado en un vial de 40 ml con tapón de teflón para su cuantificación (Figura 3.6).



**Figura 3.6. Rotavapor o Concentrador**

#### 3.3.1.4. *Caracterización y Cuantificación de los HAP*

La metodología de determinación de HAP mediante la técnica de Cromatografía de gases con detector de longitud de onda variable. El equipo utilizado es marca Perkin Elmer Arnel (Figura 3.7), detector de longitud de onda variable e inyector

manual, para la separación se utilizó una columna, en fase reversa C18, de 250 mm X 4.6 mm X 3  $\mu$ m.

La caracterización se realizó al comparar los tiempos de retención de cada hidrocarburo con los correspondientes HAP de la dilución del patrón de referencia, considerados por la USEPA como contaminantes prioritarios.

La curva de calibración es específica del tipo de hidrocarburo por analizar y se prefiere tomar una muestra proveniente del suelo contaminado. A partir del extracto orgánico obtenido se puede conocer su peso y preparar una serie de diluciones e inyectarlas al cromatógrafo de gases, con el fin de obtener una curva de concentración conocida contra área de picos resueltos. Lo anterior permitirá extrapolar el área de la muestra problema en la curva de calibración y conocer la concentración de la misma.



**Figura 3.7. Equipo Perkin Elmer Arnel**

Antes de la caracterización y cuantificación definitiva de los HAP, fueron probadas diferentes condiciones cromatográficas. Con esas condiciones se logró obtener una buena separación (90 % de la muestra) de una mezcla de patrones. Se

hicieron las curvas de calibración de cada uno de estos compuestos y se determinaron los límites de detección. Igualmente, fueron analizadas las primeras muestras mediante esta técnica con resultados aceptables, que están en evaluación.

Para la calibración del método espectrofotométrico se prepararon patrones a partir de una mezcla de hidrocarburos comerciales (naftaleno, fenantreno y pireno) con una concentración del 99%. Después de realizar tres curvas de calibración y observar la de mejor comportamiento se eligió la que arrojó el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) más cercano a 1 (Figura 3.8). De acuerdo con los datos obtenidos, el valor de  $R^2$  se acercó mucho al valor ideal el cual es 1, esto indica que la curva de calibración se aproxima con una línea recta, indicando alta correlación entre las variables (Eurachem, 1998).

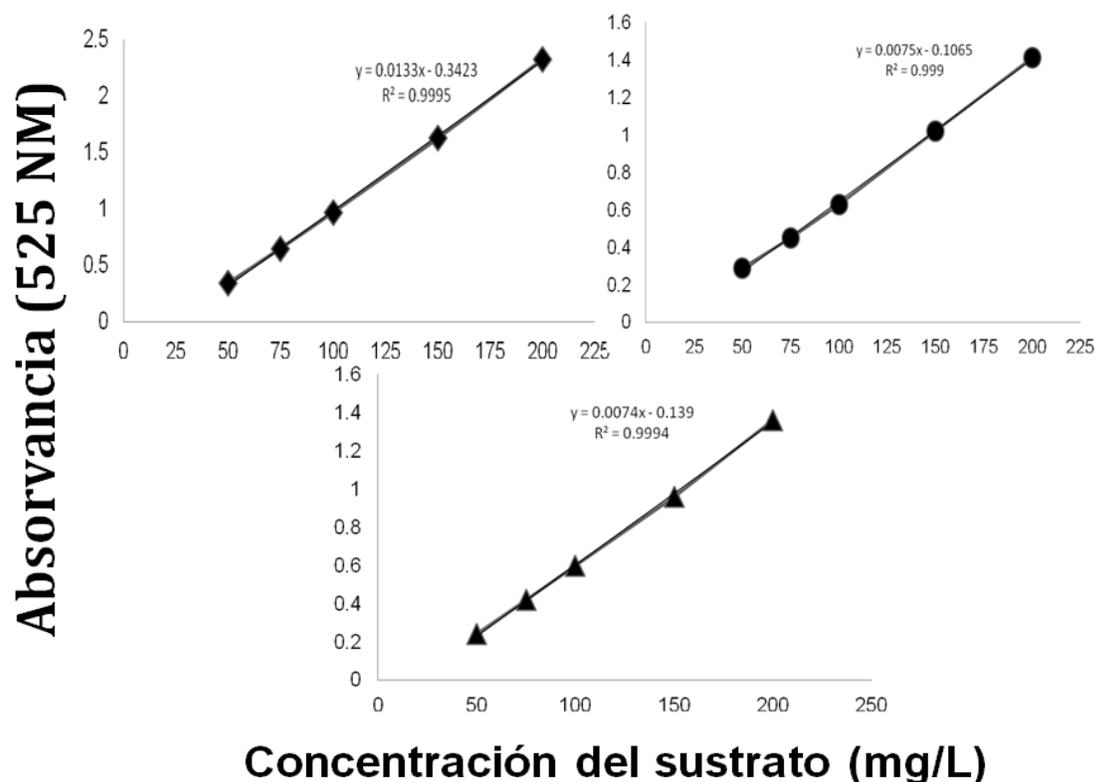


Figura 3.8 Curva patrón del Naftaleno (■), Fenantreno, (●) y Pireno, (▲)

Se calcularon los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y la ecuación de las curvas (Tabla 3.4), obteniéndose valores de  $R^2$  muy cercanos a 1.0, lo que indica que la curva tiene un comportamiento lineal y directamente proporcional, con una baja dispersión de valores.

**Tabla 3.4. Tiempos de retención de los 3 tipos de PAH estudiados**

COMPUESTOS		TR(mim)±S	PESO MOLECULAR	$R^2$	ECUACION DE LA CURVA
Naftaleno	Nap	13.2 ± 0.09	128.17	0.999	Y=0.011x-0.243
Fenantreno	Phe	23.7 ± 0.27	178.23	0.999	Y=0.007x-0.106
Pireno	Pyr	33.6 ± 0.06	202.26	0.999	Y=0.007x-0.133

Tr: tiempo de retención promedio; S: desviación estándar.

La determinación de la recuperación, expresada como porcentaje de recuperación (%R), se analizó por duplicado, a una muestra real, cuya concentración estuvo cercana al 50% del rango Eurachem, 1998.

Las condiciones de calibración recomendada por el método EPA 8015C (2000) para el análisis de hidrocarburos se en lista en la Tabla 3.5.

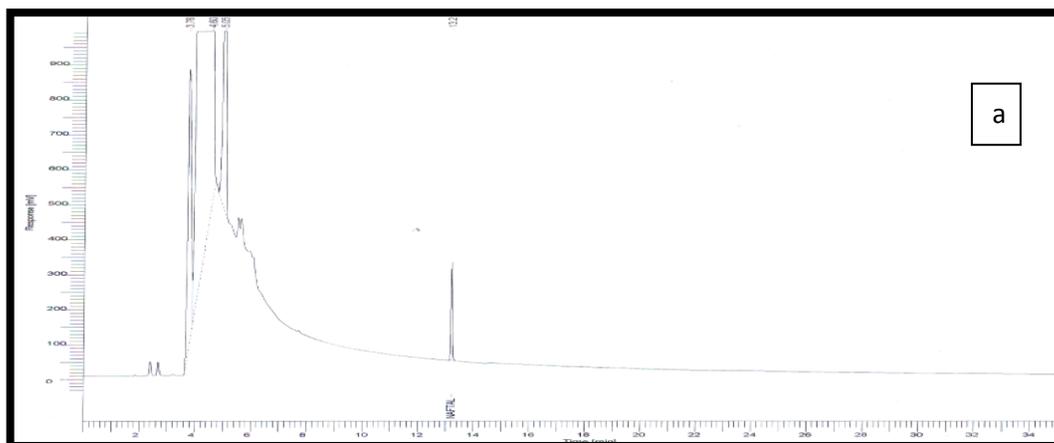
Los criterios de aceptación para una calibración inicial están basados en datos estadísticos generados por la construcción de una curva de calibración. De acuerdo al método empleado, se pueden utilizar modelos lineales y no lineales que dependen de las limitaciones del sistema de datos como también de la experiencia del analista. Basado por la experiencia el conocimiento, quizás un modelo de calibración está basado en una regresión de mínimos cuadrados, tratado como variable dependiente (y), y la cantidad como variable independiente (x).

**Tabla 3.5. Condiciones Cromatográficas**

<b>Temperatura del Detector</b>	<b>270 °C</b>
<b>Temperatura del Inyector</b>	<b>100 °C</b>
<b>Rampa de temperatura</b>	<b>60 °C a 250 °C en 13 min.</b>
<b>Temperatura inicial</b>	<b>60 ° C</b>
<b>Velocidad del flujo del gas acarreador</b>	<b>He (99.999 % pureza)</b>
<b>Velocidad del Inyector</b>	<b>2 uL, Split</b>
<b>Programa</b>	<b>AutoSystem XL con detector FID</b>
<b>Temperatura final</b>	<b>250</b>

### 3.3.1.5. *Determinación de pH*

El pH se determinó por el método electrométrico, utilizando un potenciómetro. Se pesaron 5g de muestra y se adicionó 12.5 mL de agua realizando la lectura a una temperatura de 23 °C.



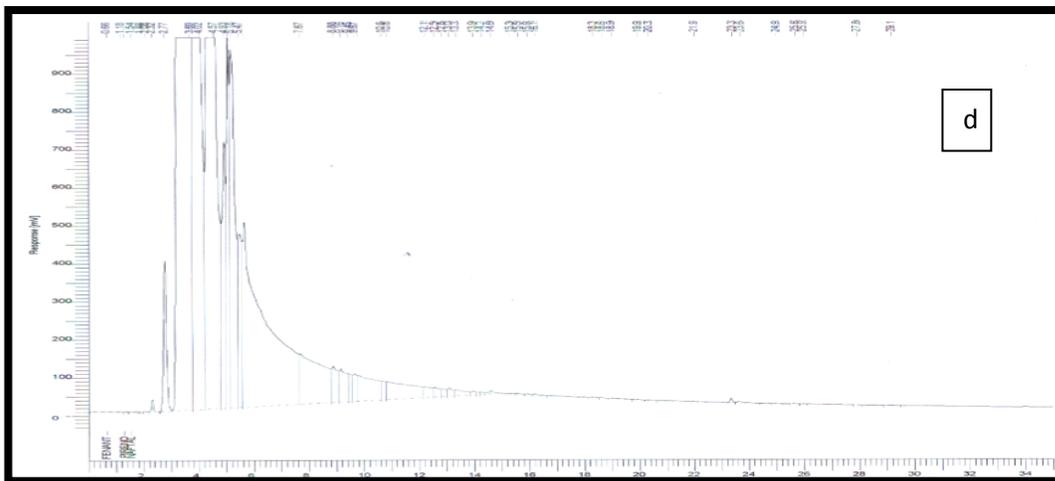
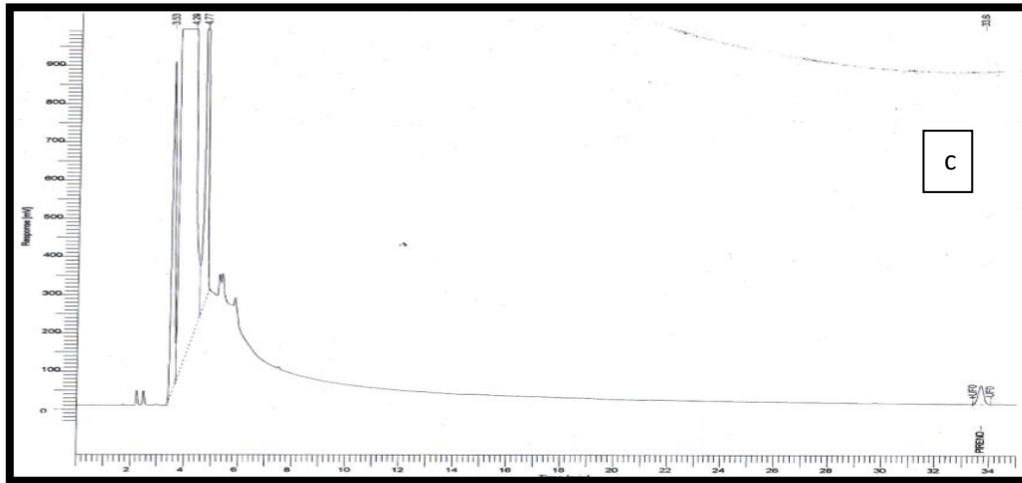
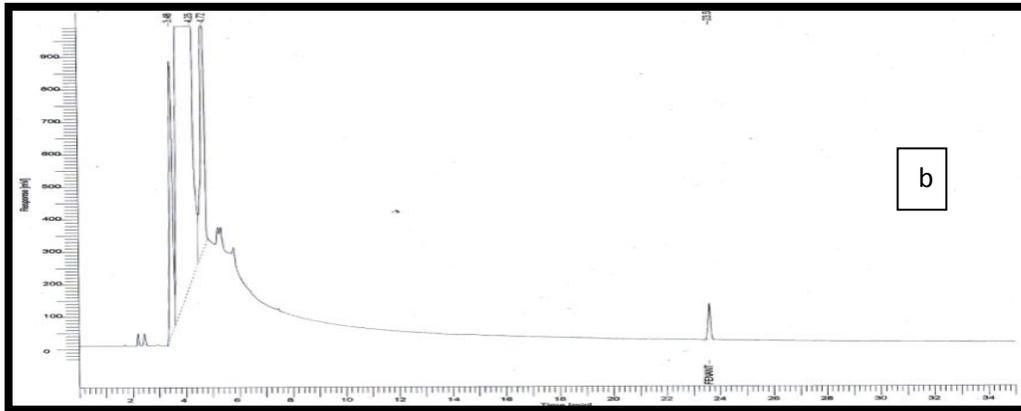


Figura 3.9. Cromatograma patrón de los patrones naftaleno (a), fenantreno (b), pireno (c) y el blanco (d) obtenido durante la optimización de las condiciones cromatografía

### 3.4. Resultados y Discusión

#### Textura

La determinación de la textura de los sedimentos es primordial en los estudios de los sistemas acuáticos porque se ha demostrado que la adsorción de contaminantes orgánicos hidrofóbicos y metales se correlaciona con ambos (Calva *et al.*, 2006).

Mediante el sistema ternario de Shepard (Figura 3.10), los sedimentos estudiados se pueden clasificar en arenosos, limosos y arcillosos. En ella, la mayoría de las muestras presentaron texturas del tipo Limo arcilloso, en las E1, E2, E4, y E5, ya que los niveles de limo estuvieron superiores al 80% (Tabla 3.6); y de textura arcillosa en las estaciones identificadas, las cuales presentaron niveles de arcilla mayores al 15% (Tabla 3.6), a diferencia de la E3 (de referencia), la cual es de tipo limo, ya que presentó un valor de la fracción limo superior al 90% (Tabla 3.6) (Grafica de datos en anexos A3.1). Las corrientes marinas, el aporte del Río Folks, las descargas de las aguas residuales como también el movimiento de los buques, pueden ser los factores más importantes que controlan las fracciones granulométricas de la Zona.

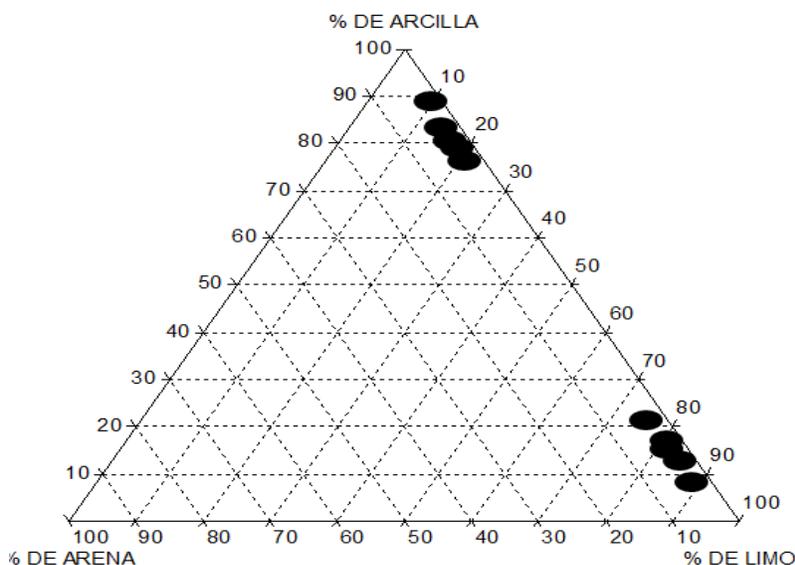
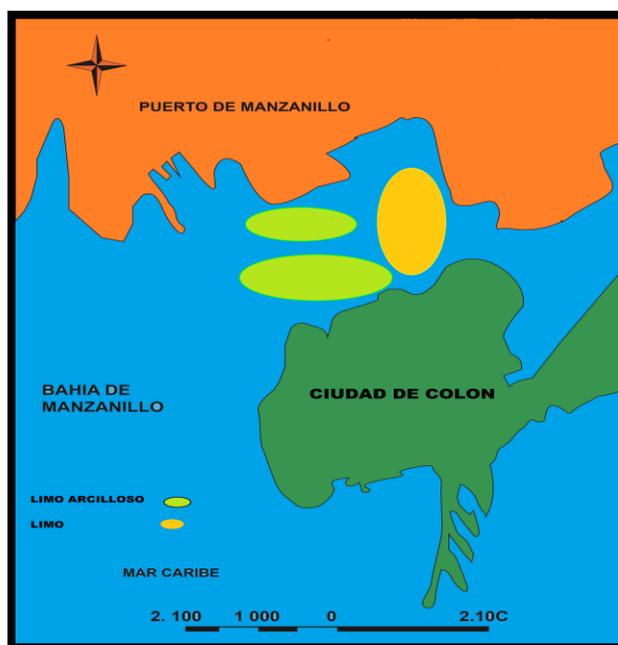


Figura 3.10. Distribución granulométrica de los sedimentos costero de la Bahía de Manzanillo

La distribución de las fracciones granulométricas, según Aguilera (2005), están condicionada a factores como la topografía, velocidad y dirección de los vientos y a las diversas corrientes generadas durante el régimen de pleamar y bajamar.

**Tabla 3.6. Porcentaje de las diferentes fracciones granulométricas obtenidas en los sedimentos superficiales de la Bahía de Manzanillo**

Estación	% Arena	% Limo	% Arcilla	Textura
1	0,00	80,00	20,00	Limo arcilloso
2	0,00	83,00	17,00	Limo arcilloso
3	0,00	90,00	10,00	Limo
4	0,00	83,00	17,00	Limo arcilloso
5	0,00	84,00	16,00	Limo arcilloso
<b>Prom</b>	0,00	84,00	16,00	-
<b>Max</b>	0,00	90,00	20,00	-
<b>Min</b>	0,00	83,00	16,00	-



**Figura 3.11. Distribución espacial de los sedimentos en la Bahía de Manzanillo. (-----) Limo arcillosos y (-----) Limo.**

En su gran mayoría, todas las estaciones presentaron más del 80 % de limo arcilloso. Únicamente en la estación 3 se encontró solo el 10 % de limo (Figura 3.11).

### *Contenido de Materia Orgánica*

La materia orgánica particulada representa la fuente más importante para el sedimento. Manheim *et al.* (1970), han estimado que las partículas representan de un 20 al 40 % en ambientes costeros. En la mayoría de los medios acuáticos la materia orgánica disuelta es mayor que la particulada, sin embargo en las lagunas y estuarios son frecuentemente similares.

El aporte de materia orgánica al sedimento es altamente favorecido por la macrovegetación; Mann (1972), ha estimado que menos del 10 % de la producción de macroalgas entra en las cadenas de pastoreo, el resto es descompuesto por microorganismos del sedimento. La producción de la vegetación del sistema costero es muy significativa, comparada con los sistemas adyacentes (De la lanza, 1983).

Para La Manna, 2007; la materia orgánica puede ser más abundante en sedimentos finos que en gruesos; sin embargo, de acuerdo a Dale (1974), encuentra que es mayor en sedimentos de limo y arcilla más que en arena. En el caso de la zona de estudio, Bahía de Manzanillo, predominan sedimentos limo arcilloso y solo cerca de la zona influenciada por el Río Folks predomina el Limo dónde se encontraron los valores más altos que corresponde a ambos periodos tanto lluvioso como seco. Cabe señalar que el contenido de materia orgánica es dinámico y pueden cambiar con base en la concentración en la columna de agua y en función de procesos de degradación bacteriana y por la actividad de los organismos bénticos. De acuerdo a Christodoulatos y Moihuddin (1996); Fall *et al.* (2001); Domínguez *et al.* (2004), mientras mayor es el porcentaje de finos mayor es su capacidad de adsorber sustancias orgánicas, como en este caso lo son los hidrocarburos, como los HAP.

Los valores de materia orgánica mostraron en esta ocasión mayor homogeneidad, y la tendencia a la disminución con la profundidad no fue tan evidente. La concentración de materia orgánica osciló entre 8 a 32 %, correspondiendo en la época seca los valores más altos y a la época lluviosa los más bajos.

Como se muestra en la Tabla 3.7, la Bahía de Manzanillo presenta valores ricos y extremadamente ricos de materia orgánica; lo que favorece la actividad metabólica bacteriana, aumentando la capacidad de biodegradar compuestos recalcitrantes, como lo son los HAP, esto fue explicado por Domínguez *et al.* (2002); Godoy *et al.* (1999); Martínez *et al.* (2000).

**Tabla 3.7. Valores de materia orgánica (como porcentaje del peso seco) en el sedimento de analizados en esta investigación.**

Estaciones de Muestras	Materia orgánica (%)		Característica
	Seco	Lluvioso	
1	15	8	Rico/Extremadamente ricos
2	32	14	Extremadamente ricos
3	30	13	Extremadamente ricos
4	32	8	Rico/Extremadamente ricos
5	27	13	Extremadamente ricos

Según Establier *et al.* 1984, plantea que las concentraciones en los sedimentos marinos son normales cuando el porcentaje de materia orgánica oscila entre 0,1 y 10.

Los valores promedios de materia orgánica estuvieron referenciados por zonas de actividad humana, como descargas de aguas residuales o uso intenso de la zona, donde se presentaron valores más bajo, sin embargo, donde existe las influencias de la actividad propia de la ciudad, ahí se presentaron los valores más altos.

En la Bahía de Manzanillo, los porcentaje de materia orgánica mayores de 27 % se encontraron en las estaciones más profundas, que también fueron los que obtuvieron mayor cantidad de limo arcilloso lo que puede ser asociado a una

acumulación debido a la suspensión de materiales autóctono producidos en las cercanías de esas áreas.

Aguilera (2005) señaló que los sedimentos presentan un alto contenido de material orgánico, lo cual coincide con las mayores concentraciones de limos y arcillas, debido a la alta capacidad de adsorción de los finos (Christodoulatos y Mohiuddin, 1996). Específicamente en la región costera, por las diversas actividades pesqueras, domésticas y las escorrentías continentales las cuales aportan todo tipo de materiales de desechos que una vez degradados, se sedimentan desde la columna de agua. Por otra parte, afirmó que la concentración de materia orgánica está favorecida por el tipo de grano grueso y por el sistema de corriente presente en esta zona que permite la exportación de la materia orgánica fresca hacia otras regiones adyacentes.

Gomes y Azevedo, (2003) señalaron que los sedimentos son considerados pobres cuando el porcentaje de material orgánico es menor a 0,5%. De tal modo, los sedimentos de la Bahía de Manzanillo pueden ser considerados extremadamente ricos en material orgánico debido a que todos los valores reportados en este estudio son superiores a dicho valor, con un promedio de 27% en la estación seca y 11% en la estación lluviosa.

En el caso de la Bahía de Manzanillo el sedimento aporta una gran área superficial para la absorción de los productos químicos, proceso que de ordinario ejerce un efecto estabilizador. Por otra parte, la adsorción de las sustancias tóxicas reduce su disponibilidad para los organismos y compensa el aumento de la persistencia (Mendiguchía, 2005).

En todos los casos las mayores concentraciones de los indicadores de la materia orgánica se localizan próximas a la desembocadura de los ríos y emisores de fuentes contaminantes o se relacionan con la mayor producción primaria estimulada por la concentración de nutrientes (Perigo *et al.*, 2005).

### Determinación de pH

El pH se determinó por el método electrométrico, utilizando un potenciómetro. Se pesaron 5 g de muestra y se adiciono 12.5 ml de agua. En la Figura 3.8, se muestra datos obtenidos del pH, Temperatura, coliformes y Escherichia coli de cada uno de los sitios analizados.

**Tabla 3.8. Valores de pH, temperatura y coliformes en el sedimento de la Bahía en el Periodo Lluvioso (a) y seco (b)**

#### Periodo Lluvioso (a)

Prueba	E1	E2	E3	E4	E5
pH	7.83	7.08	7.25	7.45	7.33
Temperatura (oC)	22.6	22.7	22.8	22.6	22.8
Coliformes Totales (NMP)	4.2	4.2	2.22	49.	1.5
Escherichia coli (NMP)	1.68	50	2.9	1.8	1.0

#### Periodo Seco (b)

Prueba	E1	E2	E3	E4	E5
pH	8.2	77.5	7.4	7.6	7.5
Temperatura (oC)	24.6	25.2	23.4	23.7	24
Coliformes Totales (NMP)	>1	>1	>1	1.37	>1
Escherichia coli (NMP)	>1	>1	>1	>1	>1

El pH tiene poca importancia como valor propio en los sedimentos, sin embargo, puede tener un efecto significativo sobre la biota que habita en el fondo. (Navarrete *et al.*, 2000). Se considera que el pH es estable en ambientes marinos

y cuando es menor a 7 se tienen condiciones anoxicas (Giere, 1993). La apariencia física del sedimento colectado en la Bahía de Manzanillo era, de color gris oscuro en estado fresco, gris claro una vez seco y rojizo después de estar sometido a ignición, con un valor de pH 7.4 en el periodo lluvioso y 7.6 en el periodo seco.

Los valores de pH que se registraron correspondieron en su mayoría a valores desde neutro hasta ligeramente alcalinos (7.0 – 7.8), para la estación lluviosa y entre (7.4 – 8.2) para la estación seca. Las condiciones neutras o ligeramente alcalinas, son favorables en los procesos de biodegradación (Arbely 2009, Kiely, 1999; Domínguez et al. 2002), por bacterias, y especialmente beneficiosos cuando se habla de compuestos orgánicos de difícil degradación.

#### *Temperatura*

La temperatura de los sedimentos vario entre 22.6 a 25.2 °C, en general la temperatura fue mayor en columna de agua que en los sedimentos, principalmente en aquellas estaciones relativamente profundas, hecho que fue notorio que correspondía al periodo seco. La temperatura es uno de las variables ambientales que tienen mayor impacto sobre la actividad microbiana (Arbely 2009, Kiely, 1999; Domínguez et al. 2002), por lo cual es necesario medirlo en el sedimento; y así obtener el valor basal.

#### *Coliformes Totales y Echerichia Coli*

Las coliformes son una familia de bacterias que se encuentran comúnmente en las plantas, el suelo y los animales, incluyendo los humanos. La presencia de bacterias coliformes es un indicio de que el agua puede estar contaminada con aguas negras u otro tipo de desechos en descomposición. Generalmente, las bacterias coliformes se encuentran en mayor abundancia en la capa superficial del agua o en los sedimentos del fondo (Munn, 2004). Como se observa en la Tabla

3.9., los valores en sedimento de *Escherichia coli*, en período seco son menores a 1 NMP en su mayoría y también en el caso de las Coliformes totales. Se puede observar una diferencia tenue en período lluvioso, donde los valores de *Escherichia coli* en su mayoría, se encuentran entre 1 y 2.9 NMP, con la excepción de un solo punto donde se encontró 50 NMP. Y en el caso de las Coliformes totales el rango se encuentra entre 2 y 4.2; con la excepción de un punto donde se encontró 49 NMP.

#### *Extracción y caracterización de hidrocarburos en sedimentos*

Las muestras son analizadas en un grupo referido como secuencia de análisis. La secuencia comienza con la verificación de la calibración seguido por el análisis del extracto de las muestras. Adicional se analiza el estándar de verificación al inicio y al final de la secuencia. La secuencia termina cuando el grupo de muestra fue inyectado o cuando se exceda el tiempo de retención y/o el criterio de porcentaje de desviación relativa para el estándar de verificación (Esquivel, 2007).

La concentración de cada analito en la muestra se puede determinar por el cálculo de la cantidad inyectada a partir de la respuesta del pico, usando la curva de calibración (Tabla 3.9).

Los sedimentos que se acumulan en el fondo de un cuerpo de agua son de gran valor para el estudio de esos ecosistemas, dado que conservan el registro histórico de lo acaecido en el lugar. Las sustancias tóxicas vertidas al agua, por ejemplo, tienden a depositarse en el sedimento y, si este se remueve, pueden volver a suspensión, quedando a disposición de los organismos de ese ambiente (Mariani y Pompeo, 2008). De esta manera, la composición de los sedimentos; además, de suministrar información sobre la influencia externa de fuentes contaminantes introducidas por el hombre, es un reflejo de la calidad del agua (Álvarez *et al.*, 2007). Son una parte integral e inseparable de los ecosistemas marinos, por lo que cualquier programa de gestión ambiental relativo a la calidad

del agua, estaría incompleto sin el debido estudio de sus sedimentos (Singh *et al.*, 1999).

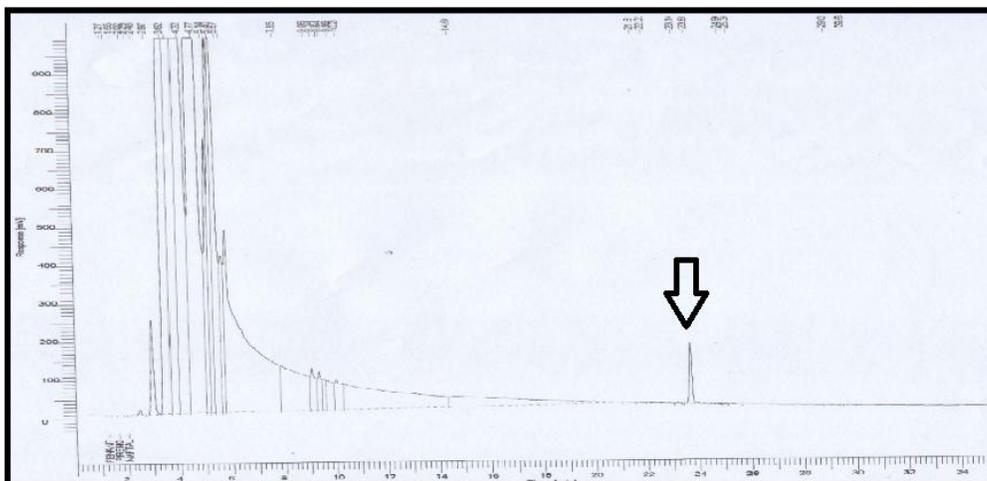
El petróleo es una mezcla compleja de compuestos polares (compuestos con azufre, nitrógeno, oxígeno o metales pesados en su estructura) y compuestos no polares (hidrocarburos) (Murgich *et al.* 1999; Centeno *et al.* 2004; Melo y Cuamatzi 2007), por lo que al utilizar hexano como disolvente en las extracciones son cuantificables algunos compuestos no polares como los hidrocarburos lineales (Centeno *et al.* 2004), que tal vez no requieren tiempos prolongados de extracción al emplear un sistema Soxhlet, cuando el sedimento estudiado presenta una textura limo arcilloso.

**Tabla 3.9. Porcentaje de Recuperación de los analitos y sus respectivas concentraciones.**

ANALITO	CONCENTRACIÓN (mg/L)	ÁREA (%)	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	CONCENTRACIÓN ENCONTRADA (mg/L)	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN (%)
<b>Naftaleno</b>	50	0.34	13.01	9	18
	75	0.62	13.2	34	45.3
	100	0.87	13.21	57	57
	150	1.46	13.21	111	74
	200	2.05	13.21	164.3	82.2
<b>Fenantreno</b>	50	0.29	24.08	26.3	53
	75	0.45	24.05	49	65
	100	0.63	23.57	75	75
	150	1.02	23.58	131	87
	200	1.41	23.59	186.3	93.2
<b>Pireno</b>	50	0.24	33.55	15.3	31
	75	0.42	33.65	41	55
	100	0.62	33.65	70	70
	150	0.96	33.70	118.14	79
	200	1.36	33.68	175.3	88

A continuación se presentan los cromatogramas y concentraciones de los HAP detectados en los sedimentos superficiales de la Bahía de Manzanillo.

De los análisis realizados (Tabla 3.10), el cromatograma de la E3 fue el que presento un valor mayor, que por su tiempo de retención corresponde al fenantreno, cuya concentración es aproximadamente 73 mg/L (Figura 3.11). También se puede observar en la Tabla 3.10 que el cromatograma del E1, presentó también un valor representativo del naftaleno, 66 mg/L y fenantreno, 11 mg/L (Figura 3.12).

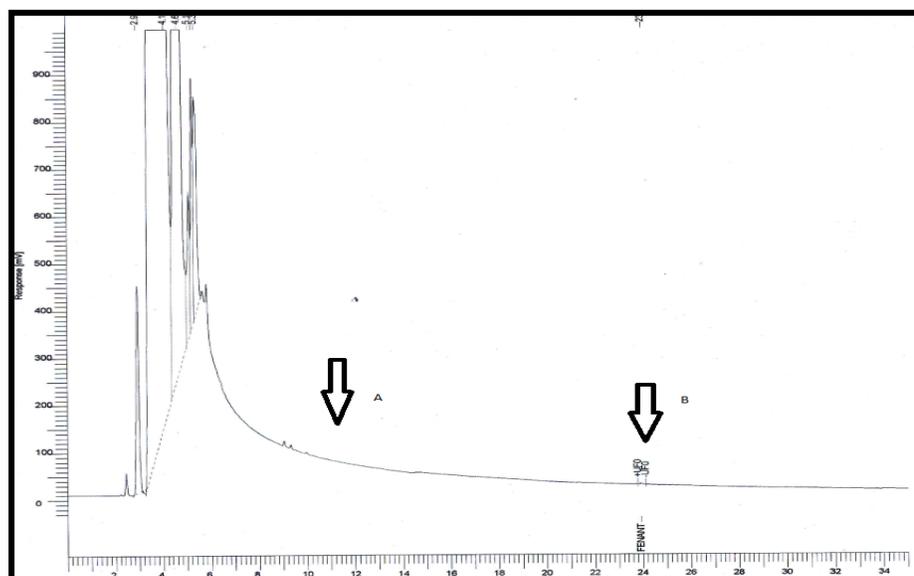


**Figura 3.12. Cromatograma de la E3**

El fenantreno es un hidrocarburo que presenta tres anillos bencénicos fusionados. No es mutagénico o carcinogénico para los humanos, sin embargo, se ha demostrado que es tóxico para los organismos acuáticos. El fenantreno suele usarse como compuesto modelo para el estudio de la biodegradación de los HAP, dado que se encuentra en altas concentraciones en las muestras ambientales (Herrera *et al.*, 2008).

El Naftaleno es una de las moléculas más complejas detectadas en el medio interestelar, está formada por 10 átomos de carbono y 8 de hidrógeno dispuestos en una configuración muy especial. El naftaleno es el poliaromático con estructura más sencilla. Presenta dos anillos bencénicos y baja masa molecular ( $128,2 \text{ gmol}^{-1}$ ). Su degradación fue una de las primeras rutas estudiadas, comprobándose

desde el principio, que el crecimiento sobre este sustrato permitía aislar salicilato y 1,2- dihidro -1,2 - dihidroxinaftaleno del medio de cultivo (Herrera *et al.*, 2008).



**Figura 3.13. Cromatograma de la E1, Naftaleno (a) y Fenantreno (b).**

La presencia de naftaleno y fenantreno en los ecosistemas se debe a la combustión incompleta de materiales orgánicos como carbón, petróleo, gasolina y madera. Una mínima porción es derivada de incendios forestales y erupciones volcánicas.

En la Tabla 3.10, se presenta las concentraciones de los hidrocarburos encontrados con sus respectivos tiempos de retención.

**Tabla 3.10 Hidrocarburos y concentraciones encontradas en la Bahía de Manzanillo.**

<b>Analito</b>	<b>Estaciones</b>	<b>Área</b>	<b>Concentración encontrada (mg/L)</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>
Naftaleno	1	0.57	66.3	14.6
Fenantreno	1	0.03	10.90	23.59
	2	0.23	18	23.76
	3	0.62	73.42	23.68
	4	0.08	4	23.56
	5	0.10	0.86	23.90
Pireno	-	-	-	-

Las fuentes antropogénicas de contaminación de ambientes acuáticos con naftaleno y fenantreno son los derrames de petróleo crudo o refinado, efluentes industriales o domésticos, suelo acarreado por erosión hídrica y depositación directa desde la atmósfera (Castro *et al.*, 2008). Tanto el naftaleno como el fenantreno, al igual que otros contaminantes pueden ser asimilados por las raíces de las plantas y acumulados, metabolizados o volatilizados (Reynolds y Skipper, 2005). De los HAP estudiados estos fueron los dos encontrados.

Al igual que en la Bahía, en los sedimentos alrededor de la montaña Qomolangma (China), Wang *et al.*, (2007) reportaron al naftaleno y fenantreno, como compuestos de los más abundantes en las muestras estudiadas. Los resultados sugirieron que las actividades antropogénicas como las descargas accidentales de algunas sustancias pueden contribuir a incrementar los niveles de HAP. Se demostró de igual manera, que los HAP en estas muestras llegaron allí por escorrentías y arrastres como también por derrames puntuales, debido a que se encuentran en los mismos niveles que en otras zonas de características similares, los cuales concuerdan con los resultados obtenidos (Falcón, 2002; Mendiguchía, 2005; Ocasio, 2008).

### 3.5. Conclusiones y Recomendaciones

El análisis fisicoquímico y microbiológico de los sedimentos fueron un parámetro importante para verificar el grado de contaminación por hidrocarburos o sus derivados; asimismo, la materia orgánica junto con la textura, sirvieron para evaluar el tiempo de retención de los analitos en el mismo.

En el caso de la Bahía de Manzanillo, en la textura, las fracciones más representativas fueron el limo (entre 83,00 y 90,00%), y la arcilla entre 16,00 a 20,00%; y la arena arrojo un 0,00% en la zona.

Sin embargo, en la estación 3, la fracción textural con mayor porcentaje fue la de limo (90,00%), seguida de arcilla (10,00%) y arena (0,00%). Cabe destacar que el sedimento predominante en la zona costera es de granos delgados.

Cabe señalar que predominan sedimentos limo arcilloso y solo cerca de la zona influenciada por el Río Folks predomina el Limo dónde se encontraron los valores más altos que corresponde a ambos periodos tanto lluvioso como seco.

Las tendencias observadas tanto en tamaño de sedimento y el contenido de materia orgánica sugieren un ambiente muy favorable para la afinidad de los compuesto orgánicos como los HAP, a la fracción sólida de la Bahía de Manzanillo; por otra parte, tanto la temperatura ( $\pm 23$  °C), como el pH neutro ( $\pm 7$ ), son favorables tanto para la actividad de tolerancia de algunas bacterias y el consumo de hidrocarburos para otras.

En todas las muestras analizadas, solo en la que corresponde al E3 que está influenciado a el aporte de la aguas proveniente del Río Folks se encontró en una concentración aproximada a 73 mg/L el compuesta fenantreno.

En el caso de la E1 se encontró una concentración de 66 mg/L de naftaleno.

El origen de este compuesto en los sedimentos de la Bahía de Manzanillo es primordialmente debido a derrames puntuales y accidentales de algunas sustancias que por escorrentías llegan al fondo arrastrado por el Río Folks.

Los tiempos de extracción de hidrocarburos y compuestos derivados del petróleo varían de un suelo o sedimento a otro dependiendo de las características físicas y químicas. Por lo cual se sugiere efectuar la extracción de hidrocarburos en sedimento, cuando se emplee un sistema de extracción Soxhlet, a tiempos diferentes de los propuestos en las normas o metodologías empleadas, para garantizar que se reportará la máxima cantidad de hidrocarburos y compuestos derivados del petróleo en el suelo que se estudie.

Después de analizar los resultados se recomienda el monitoreo de HAP en agua, sedimentos y en efluentes como una metodología adecuada para el aseguramiento de la calidad del entorno y así establecer parámetros de control y normativas de seguimientos en las zonas costeras.

### **3.6. Referencias Bibliográficas**

[1] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). [2005]. Resumen de salud pública: Naftalina, 1-Metilnaftalina y 2-Metilnaftalina. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU. < <http://www.atsdr/cdc.gov/es>>.

[2] ALEMÁN, A., [2009]. Determinación de Hidrocarburos Totales del Petróleo en suelo y sedimentos de la Cuenca del río Coatzacoalcos. Tesis

[3] ÁLVAREZ, M., MÉNDEZ, F. y CHIRINOS, J., [2007]. Estudio ambiental preliminar de los sedimentos de tres embalses de la región centro norte de Venezuela. Ciencia, 15(2): 259-269.

- [4] AGUILERA, D., [2005]. Evaluación geoquímica de los sedimentos superficiales de las bahías este y oeste del Morro de Puerto Santo, estado Sucre, Venezuela. Trabajo de Grado de Maestría Ciencias Marinas. Instituto Oceanográfico de Venezuela. Universidad de Oriente, Cumaná.
- [5] ANTIZAR-Ladislao, B., [2009]. Polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, phthalates and organotins in northern Atlantic Spain's coastal marine sediments. *Journal of Environmental Monitoring*, 11:85-91
- [6] American Section of the International Association for Testing Materials (ASTM) D5369-93. 2003. Standard practice for extraction of solid waste samples for chemical analysis using soxhlet extraction. *Environmental Assessment, Book of Standards*, Vol. 11.04, September 2004.
- [7] ARBELI, Z., [2009]. Biodegradación de compuestos orgánicos persistentes (cop): el caso de los bifenilopoliclorados (pbc). *Acta Biológica Colombiana*; vol. 14, núm. 1 (2009); 56-86.
- [8] BANJOO, D. y NELSON, P., [2005]. Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *Journal of Chromatography A*, 1066: 9–18.
- [9] BONERT, C., PINTO, L. y ESTRADA, R., [2006]. Determinación de hidrocarburos en muestras de agua y sedimentos alrededor de la isla Robinson Crusoe. *Revista Ciencia y Tecnología del Mar*, Vol. 29, Núm. 2, pp. 23-26.
- [10] BONILLA, J., ARANDA, S., RAMÍREZ, C., MOYA, J. y MÁRQUEZ, A., [2001]. Calidad de los sedimentos superficiales de la ensenada grande del obispo, Estado Sucre – Venezuela. Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Escuela de Ciencias, Cumaná, Venezuela. 2001.

- [11] BORDOVSKIY, O. K., [1965]. Transformation of the organic matter in botton sediments and its early diagenesis. Acumulation and transformation of organic substance in marine sediments. Marine Geology Special Issue, 1965. 14-86 3 (1-2).
- [12] CALVA, L., PÉREZ, A. y MÁRQUEZ, A., [2006]. Contenido de carbono orgánico y características texturales de los sedimentos del sistema costero lagunar Chantuto- Panzacola, Chiapas. Hidrobiológica, 16(2): 127-135.
- [13] CASTRO, L., DELGADILLO, J., FERRERA, R. y ALARCÓN, A., [2008]. Remoción de fenantreno por azolla caroliniana utilizando bioaumentación con microorganismos hidrocarbonoclastas. Interciencia, 33(8): 591-597.
- [14] CENTENO, G., TREJO, F., ANCHEYTA, J. y CARLOS, A., [2004]. Precipitación de asfaltenos del crudo Maya en un sistema a presión. Revista de la Sociedad Química de México 48 (3): 179-188.
- [15] CHRISTODOULATOS, C. Y MOHIUDDIN, M., [1996]. Generalized models for prediction of pentachlorophenol adsorption by natural soils. Water Environ Res 68:370-378.
- [16] CRAM, S., ORTÍZ, R. y PAÉZ, R., [2004]. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. En: Las sustancias tóxicas persistentes. Fernández, A.; Yarto, M. y Castro, J. Master print, México.
- [17] DALE, N., [1974]. Bacteria in intertidal sediments: factors related to their distribution. Limnology and Oceanography 19:509-518.
- [18] DE LA LANZA, Guadalupe., [1983]. Materia orgánica en los sedimentos del Sistema Lagunar Huizache y Caimanero: importancia, comportamiento y

significado en modelos de predicción. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología.

[19] DÍAZ, N.; ALFARO, J. y GARZA, H., [2001]. Método analítico para detectar hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua potable. Revista Ciencia UANL, Vol. 4, Núm. 4, pp.420-425.

[20] DOMÍNGUEZ, M., CORREA, J., VIDAL, G., LÓPEZ, A. Y MARTÍNEZ, M., [2002]. 2,4,6-Trichlorophenol Degradation by River Sediment Exposed to Bleached Kraft Mill Discharge. Bull Environ Contam Toxicol 69:463-470.

[21] DOMÍNGUEZ, V., VIDAL, G. Y MARTÍNEZ, M., [2004]. Sorptive behavior of chlorophenols on river volcanic sediment. Bull Environ Contam Toxicol 73:519-526.

[22] EPA-US 3541., [1994]. Automated soxhlet extraction. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods.

[23] EPA-US 3540C., [1996]. Method. soxhlet extraction. United States Environmental Protection Agency, SW-846 Manual. Washington, DC: Government Printing Office. 1-8 pp.

[24] ESQUIVEL, C., [2007]. Metodología analítica para la determinación de hidrocarburos fracción media en muestras de de suelo. Instituto Politecnico Nacional. Mexico D. F. Tesis de Pregrado.

[25] ESTABLIER, R., BLASCO, J., GÓMEZ, A. y ESCOBAR, D., [1984]. Materia orgánica en los sedimentos de la Bahía de Cádiz y sus zonas de marismas y salinas. Investigación Pesquera 48 (2): 285-301.

[26] EURACHEM, [1998]. Métodos Analíticos adecuados a su propósito, Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Tópicos. Ed. 1. 1998

[27] FALCON, R., [2002]. Degradación del Suelo, causas, procesos, evaluación e Investigación. Centro Interamericano de Desarrollo e Investigación ambiental y Territorial. Universidad de los andes, Mérida, Venezuela.

[28] FALL, C., CHAVARIE, C., CHAOUKI, J., [2001]. Generalized model of pentachlorophenol distribution in amended soil-water systems. *Water Environ Res* 73:110-117.

[29] GIÈRE, O., [1993]. Meiobenthology, the microscopic fauna in aquatic sediments. Springer-Verlag, Hamburg, 320 p.

[30] GODOY, F., ZENTENO, P., CERDA, F., GONZÁLEZ, B. Y MARTÍNEZ, M., [1999]. Tolerance to trichlorophenols in microorganism from polluted and pristine site of a river. *Chemosphere* 38:655-667.

[31] GOMES, A. y AZEVEDO, D., [2003]. Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons in Tropical Recent Sediments of Campos de Goytacazes, RJ, Brazil. *Journal Brazil Chemical Society* 14 (3): 358-368.

[32] GUIÑEZ, M., VALDÉS, J. y SIFFEDINE, A., [2010]. Variabilidad espacial y temporal de la materia orgánica sedimentaria, asociada a la zona de mínimo oxígeno (ZMO), en un ambiente costero del norte de la corriente de Humboldt, bahía de Mejillones, Chile. *Latin american journal of aquatic research*, 38(2): 242 – 253.

[33] HEDGES, J., [1992]. Global biogeochemical cycles: progress and problems. *Marine Chemistry* 39: 67-93.

[34] HERRERA, M., RODRÍGUEZ, A. y GUERRERO, Z., [2008]. Evaluación del crecimiento, actividad de hemoperoxidasas y remoción de fenantreno de los

cultivos celulares de *Fouquieria Splendens* y *Fouquieria Fasciculata*. *Polibotánica*, 25: 101-119.

[35] HOPKINSON, C. S., GIBLIN, J., TUCKER, R. H. y GARRITT., [1999]. Benthic metabolism and nutrient cycling along an estuarine salinity gradient. *Estuaries*.22 pp. 863-881

[36] HUERTA, H., [2010]. Determinación de propiedades físicas y químicas de suelos con mercurio en la Región de San Joaquín, Qro., y su relación con el crecimiento bacteriano. Tesis de grado. Campus Juriquilla Querétaro, Qro. Septiembre del 2010, México.

[37] IRWIN, R., [1997]. *Environmental Contaminants Encyclopedia*. National Park Service. U.S. Department of the Interior, Colorado.

[38] IGARZA, M., [2012]. *Materia Orgánica Sedimentaria reciente del margen continental peruano*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Tesis.

[39] KIELY, G., [1999]. *Ingeniería Ambiental: Fundamentos, Entornos, Tecnologías y Sistemas de Gestión*.1era Edición.España, Mc Graw – Hill / Interamericana de España.

[40] LA MANNA, L., BUDUBA, C., ALONSO, V., DAVEL, M., PUENTES, C., Y IRISARRI, J., [2007]. Comparación de métodos analíticos para la determinación de materia orgánica en suelos de la región Andino-Patagónica: efectos de la vegetación y el tipo de suelo. *Ciencia del suelo*, 25(2), 179-188.

[41] LESSER, M., 1995. Prospección de Contaminación de Acuíferos por Hidrocarburos. *Geólogos*. 1(6):5-8.

[42] MACKIN, J. E. y SWIDER, K. T., [1989]. Organic matter decomposition pathways and oxygen consumption in coastal marine sediments. *Journal of Marine Research*. 47 pp. 681-716

[43] MANHEIM, F. T., MEADE R. y BOND C. C, [1970]. *Science*, Suspended matter in surface waters of the Atlantic coastal margin from Cape Cod to the Florida Keys. 1970. 361-376 167.

[44] MANN, K. H., [1972]. Macrophyte production and detritus food chains in coastal waters. *Mem. Inst. Ital. Idrobiol*. 1972. 353-386 29(Suppl).

[45] MARIANI, C. y POMPEO, M., [2008]. La calidad del sedimento. *Ciencia hoy: Asociación Ciencia Hoy*, 18: 48-53.

[46] MARTÍNEZ, M., BAEZA, J., FREER, J. y RODRÍGUEZ, J., [2000]. Chlorophenol tolerant and degradative bacteria isolated from a river receiving pulp mill discharges. *Toxicol Environ Chem* 77:159-170.

[47] MENDIGUCHÍA, C., [2005]. Utilización de ultratrazas de metales pesados como trazadores de los efectos antropogénicos producidos en ecosistemas acuáticos. Tesis doctoral. Universidad de Cádiz.

[48] MELO, R. y CUAMATZI, O., [2007]. *Bioquímica de los procesos metabólicos*. 2a. ed. Reverté, México. 406 pp.

[49] MENZIE, C. A.; POTOCKI, B. y SANTODONATO, J., [1992]. Exposure to carcinogenic polycyclic hydrocarbons in the environment. *Environmental Science & Technology*. 26:1278-1284.

[50] MOREHEAD, R., EADIE, J., LAKE, B., LANDRUM, P. y BERNER, D., [1986]. The sorption of PAH onto dissolved organic matter in the Lake Michigan waters. *Chemosphere*, 15:403-412.

[51] MUNN, C., [2004]. *Marine Microbiology: ecology and applications*. New York: BIOS Scientific Publisher; 2004.

[52] MURGICH, J., ABANERO, A. y STRAUSZ, O., [1999]. Molecular recognition in aggregates formed by asphaltene and resin molecules from the athabasca oil sand. *Energy & Fuel* 13(2): 278-286.

[53] NAVARRETE, A., RIVERA, J., BELTRAN, V. y LOPEZ, N., [2000]. Distribución de los sedimentos en la Bahía de Chetumal, Quintana Roo. Mexico. *Hidrobiología*, 2000 10 (1): 61-67.

[54] NIETO, O., ABOIGOR, J., BUJÁN, R., N'DIAYE, M., GRAÑA, M., SACO-Alvarez, L., FRANCO, A., SORIANO, A. y BEIRAS, R., [2006]. Temporal Variation of the levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Galician coast after the Prestige oil spill. *Marine Ecology Progress Series*, 328:41-49.

[55] OCASIO, F., [2008]. Evaluación de la Calidad del Agua y posibles fuentes de contaminación en un segmento del Río Piedra. Tesis de Maestría. Universidad Metropolitana, San Juan, Puerto Rico.

[56] PEÑA, A., MORALES, J., LABASTIDA, C. y CAPELLA, S., [2003]. Extracción en fase sólida como una alternativa para el procedimiento de limpieza en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía de gases: aplicación a organismos marinos. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 19(1):13-23

[57] PERIGÓ, E., MONTALVO J., MARTÍNEZ, M., RAMÍREZ, O., ÁLVAREZ, G.,

SIMANCA, J., PERIGÓ, A., BALLÓN, C. y PÉREZ, S., [2005]. Presiones Antropogénicas y su relación con la Calidad Ambiental de la Ecoregion del Golfo de Batabanó. Impactos Y Respuestas. Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 36, No. Especial, 2005

[58] PING, L. y PANUWAT, H., [2006]. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on lime spray dryer (LSD) ash using different extraction methods. Chemosphere. 62: 265-274.

[59] PRIMO, E. y CARRASCO, J. [1973]. Química Agrícola I. Suelos y fertilizantes. 1era. edición. Editorial Alhambra, S.A. España.

[60] PONS-JIMÉNEZ, M., GUERRERO-PEÑA, J., ZAVALA-CRUZ, A. Y ALARCÓN, M., [2011]. Removal of oil and petroleum compounds from soils with different physical and chemical characteristics Instituto Mexicano del Petróleo. Distrito Federal. Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. México.

[61] REYNOLDS, C. y SKIPPER, H., [2005]. Bioremediation of contaminated soils. Principles and Applications of Soil Microbiology. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ, EEUU. Págs. 536-561.

[62] REVHSBECH, P., SØRENSEN, H., BALCKBURN, y LOMHOLT J., [1980]. Distribution of oxygen in marine sediments measured with microelectrodes. Limnology and Oceanography. 2 pp. 403-411

[63] SANTA, J.; SERRANO, M., y STASHENKO, E., [2002]. Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de hidrocarburos presentes en aguas residuales industriales. Revista Ciencia Tecnología y Futuro, Vol. 2, Núm. 3, pp. 49-60.

[64] SHEPPARD, F., [1954]. Nomenclature based on sand-silk-clay ratios. Journal of Sedimentary Petrology, 24(3): 151-158.

[65] SILVA, N. [2006]. Características físicas y químicas de los sedimentos superficiales de canales y fiordos australes. Avances en el conocimiento oceanográfico de las aguas interiores chilenas, Puerto Montt a cabo de Hornos. Comité Oceanográfico Nacional - Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

[66] SINGH, A., HASNAIN, S. y BANERJEE, D., [1999]. Grain size and geochemical partitioning of heavy metals in sediments of the Damodar River: a tributary of the lower Ganga, India. Environmental geology, 39 (1): 90-98

[67] STELLMAN, J. y MCCAN, M., [1998]. "Hidrocarburos poliaromáticos". Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. 1998 ed., Págs. 310-319

[68] STRAKHOV, M., [1960]. Principles of the Theory of lithogenesis. Izd. Akad. Nauk S.S.S.R., Mozeow.

[69] TRACZEWSKA, M., [2000]. Changes of toxicological properties of biodegradation products of anthracene and phenanthrene. Wat. Sci. Tech. 41: 31-38.

[70] USEPA, [1996]. Test methods for evaluating solid waste. Physical/chemical methods. Environmental Protection Agency United States of America publication (SW-846 on-line). Third edition.

[71] VIÑAS-Diéguez, L., [2002]. Tesis doctoral: Evaluación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE) en el Entorno Marino Gallego. Química Analítica y Alimentaria. Vigo, Universidad de Vigo: 267pp.

[72] VIVES, I., GRIMALT, J. y GUITART, R., [2001]. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos. *Apuntes de ciencia y tecnología*, 3: 45-51.

[73] WANG, X., YAO, T., CONG, Z., YAN, X., KANG, S. y ZHANG, Y., [2007]. Concentration level and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and grass around Mt. Qomolangma, China. *Chinese Science Bulletin*, 52(10): 1405-1413.

## ***Capítulo IV***

**Aislamiento, Identificación y Ensayos de Biodegradación de  
Microorganismos con capacidad de tolerar y/o degradar Hidrocarburos  
Aromáticos Policíclicos en sedimento de la Bahía de Manzanillo.**

#### **4. Aislamiento, Identificación y Ensayos de biodegradación de Microorganismos con capacidad de tolerar y/o degradar Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en sedimento de la Bahía de Manzanillo.**

##### **4.1. Introducción**

###### *4.1.1. Biodegradación de los HAP*

En el ambiente, los hidrocarburos muestran una biodegradación moderada. Sin embargo, la oxidación biológica es uno de los principales mecanismos por los cuales estos compuestos son eliminados del ambiente. Esto se debe a algunas características de los microorganismos tales como la producción de emulsificantes naturales que favorecen la solubilidad de los contaminantes y a la hidrofobicidad de su pared celular. Inclusive está documentada la actividad microbiana para la degradación de petróleo crudo (Ortiz, 2004).

La composición puede determinar las tasas de biodegradación. En general se considera que los crudos de petróleo ricos en azufre y en aromáticos son los de más difícil degradación. La composición tampoco es constante a lo largo del tiempo y varía en el proceso de envejecimiento debido a procesos bióticos y abióticos (evaporación entre 40 y 50% se evapora en unas horas o pocos días, solubilización, fotooxidación, dispersión emulsión, adsorción a partículas, sedimentación) (Díaz, 2007).

###### *4.1.1.1. Microorganismos degradadores de HAP*

Los microorganismos se adaptan o desarrollan su metabolismo en función de los parámetros físico-químicos (pH, temperatura, humedad) así como de los compuestos químicos que se encuentran en su ambiente inmediato. El petróleo y los hidrocarburos se encuentran naturalmente presentes en el suelo, lo que ha

permitido a muchos microorganismos acostumbrarse a su presencia y utilizarlos para sobrevivir (Wayens, 2004).

De igual manera ha sido registrado por otros autores el aislamiento de estas especies en ambiente marinos (Narváez, 2008). *Pseudomonas* es el género que con mayor frecuencia se aísla de ambientes contaminados con hidrocarburos (Norman *et al.*, 2002) y de la cual mayor información ha sido registrada; se conoce su capacidad para crecer sobre una amplia variedad de hidrocarburos del petróleo como benceno, naftaleno, tolueno (Haigler *et al.*, 1993), gasolina, kerosene y diesel (Wongsa *et al.*, 2004). En su gran mayoría las bacterias degradadoras de hidrocarburos se encuentran en el grupo de Gram negativas (Ruberto *et al.*, 2003).

La degradación de hidrocarburos se lleva a cabo principalmente por bacterias, seguidas por los hongos, levaduras y algas, entre otros (Tabla 4.1). En un estudio comparativo de poblaciones, se observaron que las bacterias participaron en el 82% de la degradación de n-hexadecano y los hongos con un 13% (Ríos, 2005).

**Tabla 4.1. Principales géneros más comunes de levaduras, hongos y bacterias que tienen la capacidad degradadora del petróleo.**

GÉNEROS DE LEVADURAS	GÉNEROS DE BACTERIAS		GÉNEROS DE HONGOS	
Candida	Chromobacterium	Micrococcus	Acremonium	Gliocladium
Cryptococcus	Corynebacterium	Spharicus	A s p e r g i l l u s	G r a p h i u m
Endomyces	Cytophaga	Nocardia	Aureobasidium	Humicola
Hansenyla	Flavobacterium	Proteus	Beauveria	Monilia
Mycotorula	Brevibacter	Pseudomonas	Botrytis	Mortierela
Pichia	Erwinia	Sarcina	Candida	Paecelomyces
Rhodotorula	Acinetobacter	Serratia	Chryisosporium	Penicillium
Torulopsis	Alcaligenes	Spirillum	Cladosporium	Rhodotorula
Trichosporon	Arthrobacter	Streptomyces	Cochlobolus	Saccharomyces
	Bacillus	Vibrio	Cylindrocarpon	Spicardia
	Brevibacterium	Xanthomonas	Debaryomyces	Tolypocladium
	Achromobacter	Neisseria	Fusarium	Thrichoderma
	Aeromonas	Pseudomonas	Geotrichum	Verticillium
	Nocardia	Rhodococcus	Corollospora	Dendryphiella
	Achromobacter	Cicrobacter	Mucor	Lulworthia
	Staphylococcus	M y c o b a c t e r i u m	Variscosporina	Sporobolomyces
	Enterobacter	Sporobolomyces		
	Shigobacter	Vibrio		
	Hafnia	Listonella		

Fuente: Maya Yescas, 2005.

En la última década, debido al desarrollo de nuevas técnicas en biología molecular se han descrito más especies de microorganismos degradadores de hidrocarburos, aislados de ecosistemas terrestres, marinos y de agua de producción petrolera, entre otros (Narváez *et al.* 2008; Van Hamme *et al.*, 2003).

Distintos han sido los aportes de muchos científicos en el mejoramiento del conocimiento de cómo los microorganismos degradan hidrocarburos en distintos ambientes (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2. Estudios reportados algunos microorganismos como potenciales degradadores de hidrocarburos aromáticos policíclicos en zonas marinas costeras**

FUENTES	AÑOS	INVESTIGACION	MICROORGANISMO	RESULTADOS
<p>Tian Yuna, Zheng Tianlinga and Wang. Xinhong</p> <p><i>Chemical Speciation and Bioavailability (2002),</i></p>	2002	<p>PAHs contamination and PAH-degrading bacteria in</p> <p>Xiamen Western Sea</p>	<i>Micrococcus sp</i>	<p>Reportaron que en el agua de la superficie fue dominado principalmente por compuestos de bajo peso molecular con HAP (2-3 anillos HAP) en julio y por el alto peso molecular compuestos de HAP (4-6 anillos HAP) en octubre. En sedimentos fueron dominados principalmente por compuestos de alto peso molecular con HAP (4-6). No se encontró correlación entre el fluoranteno que degradan el número de bacterias y la concentración de fluoranteno entre las diferentes estaciones en la superficie del agua, y la misma situación se produjo entre pireno que degradan el número de bacterias y la concentración de pireno. Sin embargo, el número de bacterias degradantes de fluoreno y fenantreno se relacionaron positivamente con el fluoreno y las concentraciones de fenantreno, respectivamente.</p>
<p>W.-Q. Zhuang<sup>1</sup>, J.-H. Tay<sup>1</sup>, A.M. Maszenan<sup>1</sup>, L.R. Krumholz and S.T.-L. Tay</p> <p>Letters in Applied Microbiology 2003, 36, 251–257</p>	2003	<p>Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria</p> <p>in oil-contaminated tropical marine sediments</p>	<p><i>Naphthovorans</i></p> <p><i>Micrococcus sp</i></p> <p><i>Staphylococcus sp.</i></p>	<p>Reportaron el aislamiento tres bacterias degradadoras de naftaleno Gram-positivas con éxito en sedimentos marinos tropicales contaminados con aceite. Las Bacterias Gram-positivas pueden desempeñar un papel importante en la degradación de naftaleno en el entorno altamente variable de los sedimentos contaminados de petróleo marinos tropicales intermareales.</p>

<p><b>Kim, Jeong-Dong, Su-Hyeun Shim, y Choul-Gyun Lee_J.</b></p> <p><i>Microbiol. Biotechnol.</i> 15(2), 337–345</p>	<p>2005</p>	<p><b>Degradation of Phenanthrene by Bacterial Strains Isolated from Soil in Oil Refinery Fields in Korea</b></p>	<p><i>Pseudomonas stutzeri</i></p>	<p>Reportan la capacidad que tiene la bacteria <i>P. stutzeri</i> en la degradación de fenantreno. Los resultados indican que la cepa tuvo la capacidad de degradar más del 90% de fenantreno en concentraciones que variaron de 250 a 1000 ppm en 6 días.</p>
<p><b>Zhisong Cui, Qiliang Lai, Chunming Dong and Zongze Shao</b></p> <p><i>Environmental Microbiology</i> (2008) 10(8), 2138–2149</p>	<p>2008</p>	<p><b>Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge</b></p>	<p><i>Pseudoalteromonas, Halomonas, Marinobacter, Thalassospira</i></p>	<p>Estos resultados confirman que las bacterias de <i>Cycloclasticus</i> son importantes degradadores obligados de PAH en ambientes marinos, y pueden convivir con otras bacterias degradadoras que habitan en los sedimentos profundos del Atlántico. Esto apoya la idea de que la acumulación de HAP y bioatenuación que ocurren son consistente y continua.</p>
<p><b>C. B. Chikere, G. C. Okpokwasili and O. Ichiakor</b></p> <p><i>African Journal of Biotechnology</i> Vol. 8 (11), pp. 2541-2544,</p>	<p>2009</p>	<p><b>Isolation and Identification of Three-Rings Polyaromatic Hydrocarbons (Anthracene and Phenanthrene) Degrading Bacteria</b></p>	<p><i>Alcaligenes sp</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Thiobacter subterraneus</i></p>	<p>Reportan Cepas bacterianas aisladas de diferentes sitios contaminados y enriquecimiento aislamiento de bacterias degradan antraceno y fenantreno.</p>

<p><b>Gustavo Eugenio Echeverri Jaramillo, Ganiveth Manjarrez Paba,</b></p> <p><b>Melody Cabrera Ospino</b></p> <p><b>Publicación Científica en Ciencias Biomedicas - ISSN:1794-2470 Vol.8 No. 13</b></p>	<p><b>2010</b></p>	<p><b>Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras</b></p> <p><b>de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia</b></p>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>	<p>Con esos resultados permitirán la realización de pruebas de biodegradación con esta bacteria y desarrollar ensayos a nivel microcosmos para su uso potencial en procesos de biorremediación de aguas marinas contaminadas con petróleo.</p>
<p><b>P. Arulazhagan; N. Vasudevan; I. T. Yeom</b></p> <p><b>Int. J. Environ. Sci. Tech., 7 (4), 639-652, Autumn 2010</b></p>	<p><b>2010</b></p>	<p><b>Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment</b></p>	<p><i>Ochrobactrum sp., Enterobacter cloacae y Stenotrophomonas maltophilia.</i></p>	<p>Reportaron la biodegradabilidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos como el naftaleno, fluoreno, antraceno y fenantreno por un consorcio bacteriano aislado en medio marino. El consorcio fue capaz de degradar 39 a 45% de los diferentes hidrocarburos policíclicos a 60 g/l concentración de NaCl. Al aumento de la salinidad, la degradación disminuyo. Para mejorar la degradación se añadió extracto de levadura como un sustrato adicional a 60g / l concentración de NaCl, degradando 74% de los hidrocarburos en 4 días. El consorcio también fue capaz de degradar los HAP a diferentes concentraciones (5, 10, 20, 50 y 100 ppm) con 30 g/l de concentración de NaCl.</p>

<p><b>Xiaoying Lu, Tong Zhang, Herbert Han-Ping Fang, Kenneth M.Y. Leung, Gan Zhang</b></p> <p><b>International Biodeterioration &amp; Biodegradation 65 (2011) 204e211</b></p>	<p><b>2011</b></p>	<p><b>Biodegradation of naphthalene by enriched marine denitrifying bacteria</b></p>	<p>Proteobacteria Actinobacteria Pseudomonas</p>	<p>En este estudio, cuatro series de experimentos se llevaron a cabo por lotes para investigar el efecto de la temperatura, pH, concentración de naftaleno y la concentración de nitrato en la degradación de naftaleno en condiciones de desnitrificación. Nuestros resultados mostraron que la degradación de naftaleno fue más favorable a pH 7 y 25 ° C.</p>
<p><b>Lies Indah Sutiknowati</b></p> <p><b>Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis, Vol. 3, No. 1, Hal. 91-103</b></p>	<p><b>2011</b></p>	<p><b>Microbial community during bioremediation experimental on oil spill in coastal of Pari Island</b></p>	<p>Alcanivorax, Marinobacter y Prosthecochloris.</p>	<p>Los resultados mostraron La adición de fertilizantes fue afectan a la comunidad microbiana, sin embargo el efecto de los fertilizantes no consistencia. Los microbios que juegan papel en la biodegradación de petróleo crudo podrían ser diversos.</p>

#### 4.1.1.2. Factores que influyen en la degradación microbiana de los hidrocarburos

El crecimiento de un microorganismo o el tamaño y productividad de una comunidad están limitados por estos factores biológicos y ambientales. Al tener condiciones apropiadas los microorganismos se multiplican y compiten por el espacio, la cantidad total de espacio en el suelo disponible por lo general no está limitada, pero hay un número limitado de micro-hábitat apropiado que contienen nutrientes, oxígeno, entre otros. En estas condiciones es posible que haya más competencia por espacio utilizable que por espacio total (Díaz, 2007).

Existen varias condiciones que se tienen que satisfacer para que se lleve a cabo exitosamente la biodegradación de un compuesto contaminante. Ortiz en el 2004, menciona que se deben tener los microorganismos degradadores en las condiciones ambientales adecuadas para la proliferación de las poblaciones y la accesibilidad de los compuestos contaminantes.

El ataque inicial intracelular del contaminante orgánico es un proceso oxidativo y la activación así como la incorporación de oxígeno es la clave enzimática en la reacción catalizadora por oxigenasa y peroxidasa (Figura 4.1).

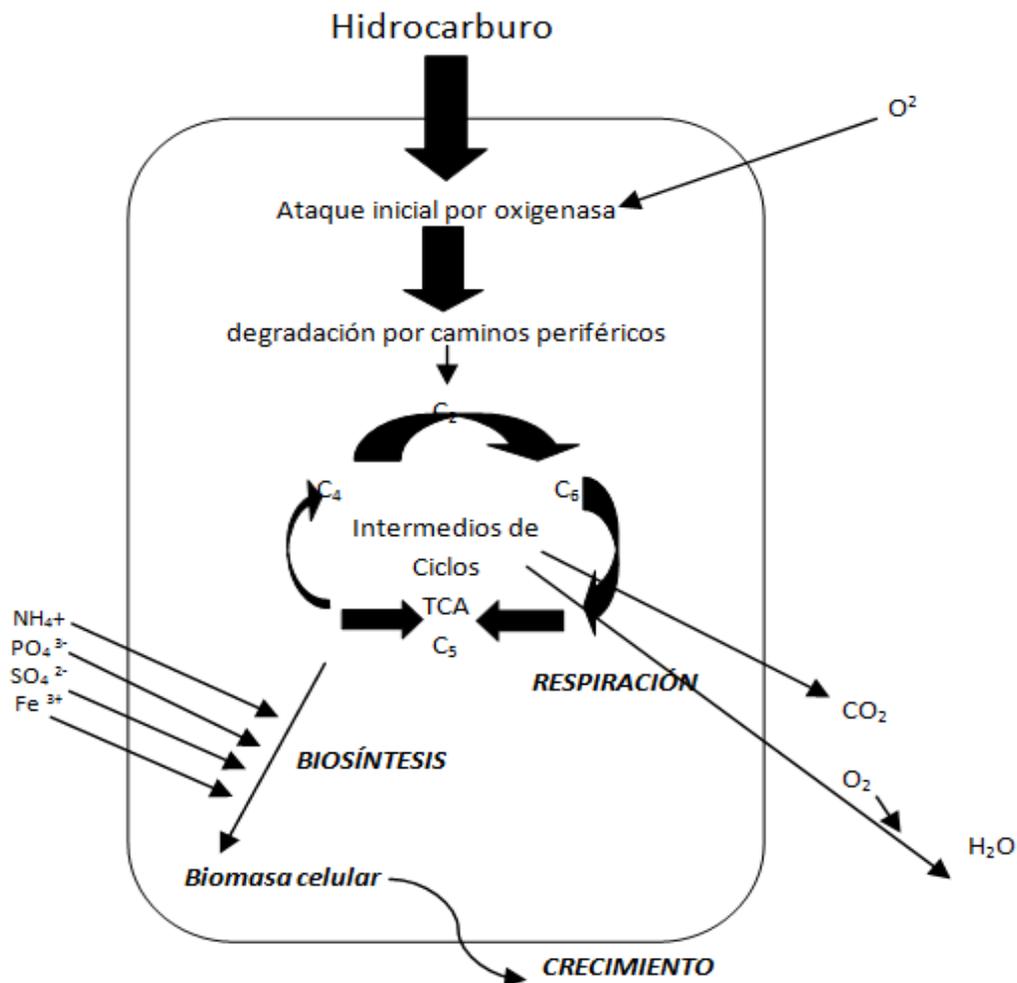


Figura 4.1 Procesos principales en la degradación de hidrocarburo por microorganismo (A. Izquierdo Romero, 2013)

Bosma *et al.* (1997), citan que dos de los factores críticos que afectan la tasa de conversión durante la biodegradación son:

- La actividad intrínseca de la célula, es decir, la actividad bioquímica de los microorganismos; y
- La tasa de transferencia de masa del contaminante a la célula.

Óptimas condiciones de ambientales reportadas para la degradación de contaminantes se encuentran en la Tabla 4.3.

**Tabla 4.3 Condiciones ambientales que afectan la degradación.**

<b>PARÁMETROS</b>	<b>CONDICIONES REQUERIDAS PARA LA ACTIVIDAD MICROBIANA</b>	<b>ÓPTIMOS VALORES PARA LA DEGRADACIÓN DE PETROLEO</b>
Suelos húmedos	25 – 28% de capacidad de retener agua	30 – 90%
pH del suelo	5.5 – 8.8	6.5 – 8.0
Contenido de oxígeno	Aeróbico, mínimo espacio de aire poroso de 10 %	10 – 40%
Contenido de nutrientes	N y p para el crecimiento microbiano	C:N:P= 100:10:1
Temperatura (°C)	15 – 45	20 – 30
Contaminantes	No demasiados tóxicos	Hidrocarburos 5 – 10% de peso seco de suelo
Metales pesados	Total de contenido de 2000 ppm	700 ppm
Tipo de suelo	Bajo contenido de arcilla o limo	

#### 4.1.2. Modelos de biodegradación

La historia de los modelos de procesos biotecnológicos, inician con las famosas ecuaciones desarrolladas por Monod en 1942 y Teissier en 1942, las cuales relacionan la concentración de sustratos limitante con la tasa de crecimiento de los microorganismos.

Unas de las principales premisas, en el desarrollo de muchos modelos de crecimientos de microorganismos, es identificar un sustrato limitante del crecimiento, en términos del cual se expresa comúnmente la tasa de crecimiento micobiano (Plaza, 2007).

Usualmente, las reacciones microbianas alcanzan su tasa máxima de crecimiento ( $u_{max}$ ) a altas concentraciones de sustrato limitantes. Por otro lado, la tasa de reacción es cero si no hay sustrato limitante disponible. De manera que la expresión para la tasa específica de crecimiento, en su forma simple, se puede escribir como producto de la tasa específica máxima de crecimiento por

una función (  $f$  ), que depende de la concentración de sustratos limitantes (  $S$  ) (Bellgardt, 1991).

Las cinéticas dependientes de sustratos simples son las más comunes y sencillas, sin embargo, en algunos casos son inadecuados, por lo cual se han desarrollado otros tipos de cinéticas para modelos no estructurados a nivel de poblaciones a saber de acuerdo a Bellgardt en 1991:

- a. Cinética de crecimiento simple y consumo de sustrato.
- b. Cinética de crecimiento independiente del sustrato.
- c. Cinética de inhibición por sustrato y producto.
- d. Cinética de sustratos esenciales
- e. Cinética de mejoramiento de crecimiento y sustratos alternativos, y
- f. Combinaciones de sustratos esenciales y alternativos.

#### 4.1.2.1. *Cinética de Crecimiento y Biodegradación*

Es importante, ya que permite conocer la concentración de una sustancia en cualquier instante, permite la predicción de niveles probable en un tiempo futuro, si el compuesto es eliminado antes de ser transportado a un compartimiento ambiental al que las personas, animales o plantas pueden ser expuestos.

Tradicionalmente el estudio de la cinética se ha centrado en dos aspectos; los factores que afectan a la cantidad de sustrato transformado por unidad de tiempo, tales como temperatura, pH, entre otras fuentes de carbono, etc., y la determinación de la forma de la curva que describe la biodegradación y la evaluación de cuál es el modelo que se ajuste mejor al metabolismo del compuesto que estamos estudiando.

#### 4.1.2.2. Cinética de Monod

El modelo de Monod no es aplicable a todas las situaciones donde se dan procesos degradativos, ya que fue concebido para cultivos puros consumiendo un único sustrato, pero existen otras muchas razones en la que el modelo puede proporcionar una buena aproximación del crecimiento de cultivos mixtos (Sibila, 2008). El modelo da una buena, aunque indirecta, descripción de la desaparición del sustrato limitando el crecimiento.

Se considera que la velocidad de crecimiento viene dada por:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

Ecuación 4.1

Donde la X es la concentración de microorganismo y  $\mu$  es la velocidad de crecimiento específica de la bacteria que degrada al sustrato, expresada como  $(\text{tiempo})^{-1}$ . Cuando se asume que el crecimiento es un proceso continuo y que la masa celular se produce durante la utilización del sustrato la ecuación queda expresada de la siguiente forma:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S}$$

Ecuación 4.2

La relación entre la velocidad de crecimiento bacteriano y la concentración de sustrato se muestra en la figura 4.2.

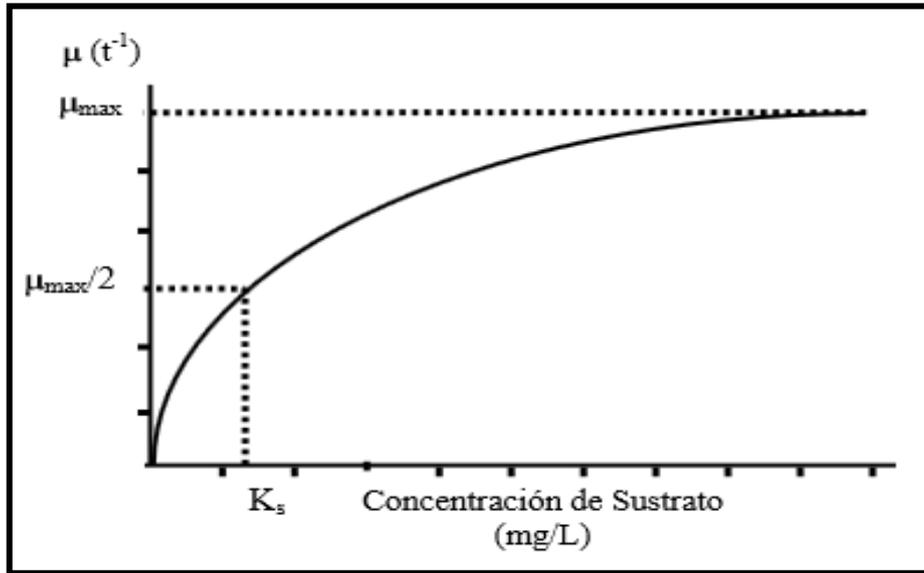


Figura 4.2. Evolución de la velocidad específica del crecimiento en función de la concentración del sustrato

Sustituyendo la ecuación anterior, se obtiene:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} \cdot S \cdot X}{K_s + S} \quad \text{Ecuación 4.3}$$

Donde  $\mu_{\max}$  es la velocidad máxima de crecimiento específico de los microorganismos y  $K_s$  es la constante de saturación de sustrato, esto es, la concentración de sustrato a la que se da la velocidad específica de crecimiento igual a la mitad de la máxima. Por lo tanto se obtiene:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_{\max} \cdot S \cdot X}{Y \cdot (K_s + S)} \quad \text{Ecuación 4.4}$$

La ecuación de Monod sin crecimiento puede ser utilizada en situaciones en la que a pesar de adicionar una cantidad de sustrato por encima del valor de  $K_s$ , la elevada densidad celular del medio hace que el aumento de la población que supone el consumo de dicho sustrato no resulte significativo en comparación con la inicial existente.

En este capítulo se presentan resultados y discusiones de diferentes bioensayos de crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de naftaleno como única fuente de carbono. Por otra parte se aísla e identifica a las cepas con capacidad degradativa y se realiza una cinética de crecimiento.

## **4.2. Objetivos**

Aislar e identificar microorganismos capaces de crecer utilizando como única fuente de carbono Hidrocarburos

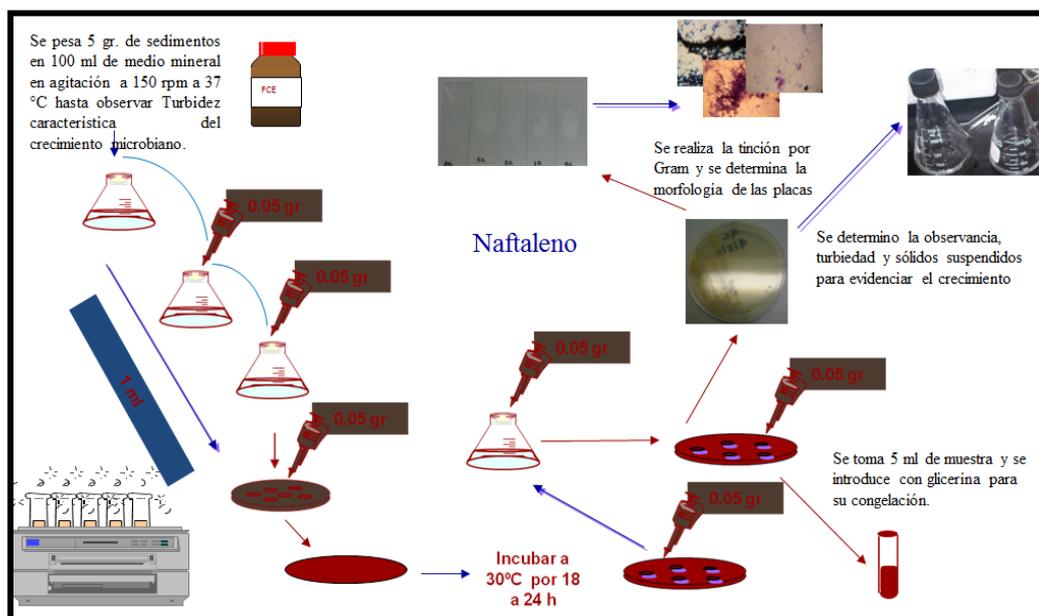
Estudiar el modelo de crecimiento y la capacidad depurativa de los microorganismos aislados en los sedimentos de la Bahía de Manzanillo.

## **4.3. Métodos y Materiales**

### *4.3.1. Diseño Experimental*

Se evaluaron las capacidades biodegradativas, de tres consorcios microbianos resultantes del enriquecimiento en distintas fuentes de carbono y energía. Se determinó si las distintas fuentes de carbono y energía utilizadas implicaban comportamientos metabólicamente distintos y selectivos frente a hidrocarburos específicos. El naftaleno, pireno, y fenantreno, adquirido de Sigma-Aldrich, fueron utilizados como única fuente de carbono para el enriquecimiento de bacterias degradantes. El consorcio bacteriano fue aislado a partir de cinco sitios de muestreo diferentes en la zona cerca al Canal de Panamá (Bahía de Manzanillo).

La inoculación se realizó con 5 g de sedimento en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 0,055% naftaleno, fenantreno y pireno. El crecimiento se determinó por el método colorimétrico que se midió por espectrofotometría a 525 nm correspondientes a una densidad óptica (OD) de aproximadamente igual a 2. Transferencia sucesiva se realizaron periódicamente al nuevo medio (Figura 4.3).



**Figura 4.3. Metodología utilizada para el aislamiento de cepas de bacterias capaces de degradar los hidrocarburos aromáticos policíclicos**

#### 4.3.2. Reactivos y Disolventes

Los hidrocarburos (líquidos y sólidos) se obtuvieron de las casas comerciales Fluka, Aldrich o Sigma. Los disolventes, principalmente utilizados para procesos de extracción, fueron de calidad para análisis de residuos orgánicos de la casa comercial Baker. Todos los compuestos utilizados fueron de la mayor pureza disponible comercialmente.

#### 4.3.3. Medios de cultivo

Se utilizó un medio basal HC como única fuente de carbono (MN), la composición del medio basal en 1 litro fue:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 3 ml;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mL;  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  10 mL;  $\text{MgSO}_4$ , 1 mL; y Elementos Trazas, 10; con 23 gramos de NaCl. Un 2 % (v/v) de HC y añadido asepticamente, se empleó como fuente de carbono en el medio MN Foght *et al.* (2001).

Los experimentos se realizaron en matraces erlenmeyers de 250 mL de capacidad con 100 mL de medio durante 10 días el naftaleno y tolueno;

mientras que el pireno 21 días. La incubación se realizó a temperatura ambiente con agitación orbital a 150 r/min. Se realizaron tres pases sucesivos a medio MMS fresco, el naftaleno y tolueno cada 7 días; mientras que al pireno y fenantreno se realizó el pase a los 21 días hasta completar un tiempo final de incubación de 28 días con agitación constante, hasta observar la turbidez característica del crecimiento bacteriano. En cada pase se tomaron 5 mL de muestra y se inoculó en un matraz de 250 ml con una capacidad de 100 mL de medio.

Al transcurrir este período, se tomó 0,1 mL, de cada fiola, y se sembró en placas que contenían el mismo medio anteriormente descrito solidificado con agar al 2%. Las placas se incubaron a 36°C hasta observar el crecimiento y la aparición de colonias aisladas. Las tomas de muestras fueron realizadas cada 8 h durante todo el período de incubación. Las cepas seleccionadas fueron escogidas por su mayor adaptación y crecimiento, utilizando como única fuente de carbono, fenantreno y naftaleno. El crecimiento fue evidenciado a través del aumento de la turbiedad en unidades de absorbancia, por espectrofotometría UV.

#### *4.3.4. Cultivo de los microorganismos sobre medio enriquecido*

La evaluación de los crecimientos sobre medio enriquecido permitió obtener información sobre las poblaciones bacterianas que servirán ulteriormente de inóculo en los medios que contienen los hidrocarburos. El objetivo fue conocer las velocidades específicas de crecimiento con el fin de determinar el tiempo de precultivo necesario para poder reducir toda posibilidad de latencia en el momento de transferirlo a un medio fresco.

Los seguimientos del crecimiento dan una idea del tiempo que toma la población en adaptarse a los compuestos del medio de cultivo (fase de latencia), del tiempo que toma en dividirse (fase exponencial) y del tiempo durante el que se mantiene antes de entrar en fase de mortalidad (fase estacionaria).

Para medir turbiedad se utilizó la Ley de Beer & Lambert (Wayens, 2004) .La turbiedad del medio puede resultar de células vivas o muertas así como de desechos celulares. La medida de la viabilidad es indispensable para evaluar la toxicidad del medio o de los potenciales de crecimiento de una suspensión celular, razón por la cual la medida de Densidad óptica (D.O.) es complementada por observaciones al microscopio y plaqueos. Estos últimos permiten verificar que la D.O. de la muestra corresponde con la opacidad producida por la presencia de células viables en el medio (Wayens, 2004).

#### 4.3.5. *Método de enriquecimiento*

En matraces de 250 ml con medio mineral estéril (150 ml) se agregaron 0.055% de solución concentrada de naftaleno, hasta tener una concentración final de 500 ppm, posteriormente se resuspendió 1 g de suelo en el medio y finalmente los matraces fueron recubiertos con papel aluminio. Durante todo el experimento los matraces de cultivo se incubaron a 28°C con una velocidad de agitación de 150 rpm durante 72 h. Los cultivos se realizaron por duplicado. Después de 72 h de cultivo evidenciado por la turbidez, se hizo una transferencia de 1 ml del medio anterior a 100 ml de medio mineral fresco con la misma concentración de naftaleno. Se incubaron a las mismas condiciones del cultivo original. Posteriormente se realizaron otras cuatro transferencias sucesivas cada 72 h. En cada transferencia se sembraron placas con agar nutritivo más naftaleno (Hernández *et al.* 1997).

De las placas obtenidas en la quinta transferencia se seleccionaron todas aquellas colonias que presentaron diferencias morfológicas y se resembraron individualmente en placas con el fin de observar su comportamiento morfológico con diferentes fuentes de carbono.

#### 4.3.6. *Inóculo*

Al consorcio obtenido se adicionaron mediante una asada los microorganismos aislados por el método de dilución en placa, se sembraron en 50 ml de medio mineral con naftaleno (500 ppm) como única fuente de carbono, se incubaron a

30°C con una velocidad de agitación de 150 rpm, diariamente fue adicionado naftaleno a la misma concentración inicial durante tres días consecutivos, finalmente se obtuvo un consorcio microbiano que fue utilizado como inóculo en los experimentos de degradación que se detallan más adelante.

#### 4.3.7. *Aislamiento de cepas degradadoras de Hidrocarburos*

Este proceso de aislamiento permite la selección de aquellas bacterias adaptadas a las condiciones que revelan las características particulares buscadas. La identificación es indispensable para el proceso de búsqueda y selección de las características de interés dentro de las bacterias aisladas, y culmina con la identificación taxonómica de aquellos aislados seleccionados. Se describió la morfología de las colonias aisladas y se practicó la tinción de gran para observar la morfología celular. Para realizar el proceso de aislamiento de la cepa bacteriana se utilizó la metodología de Hernández *et al.* (1991), Pelczar *et al.* (1995) y Wayens (2004).

#### 4.3.8. *Identificación de cepas degradadoras de Hidrocarburos*

El procedimiento de identificación se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales utilizando el sistema comercial API Coryne System (bioMérieux). API Coryne, es un sistema manual capaz de identificar en 24 horas a 49 especies de bacterias corineformes. Contiene 20 pruebas, 11 enzimáticas y 8 de utilización de hidratos de carbono, con su correspondiente control.

##### 4.3.8.1. *Ensayo de enriquecimiento y crecimiento del naftaleno*

Para estudiar la capacidad de crecimiento el naftaleno en las poblaciones bacterianas presentes en las muestras de agua, se prepararon microcosmos en matraces de 250 ml, a los que se le adicionó 100 ml de la muestra de agua en 1 litro fue: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 ml; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 ml; NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> 10 ml; MgSO<sub>4</sub>, 1 ml; y

Elementos Trazas, 10; con 23 gramos de NaCl. Luego esterilizado en autoclave (Aranda *et al.*, 2003). Al medio, se les adicionó diferentes concentraciones de naftaleno en triplicado que van desde 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, 1000 ppm y 2000 ppm e incubados de 28 °C con agitación constante a 150 rpm.

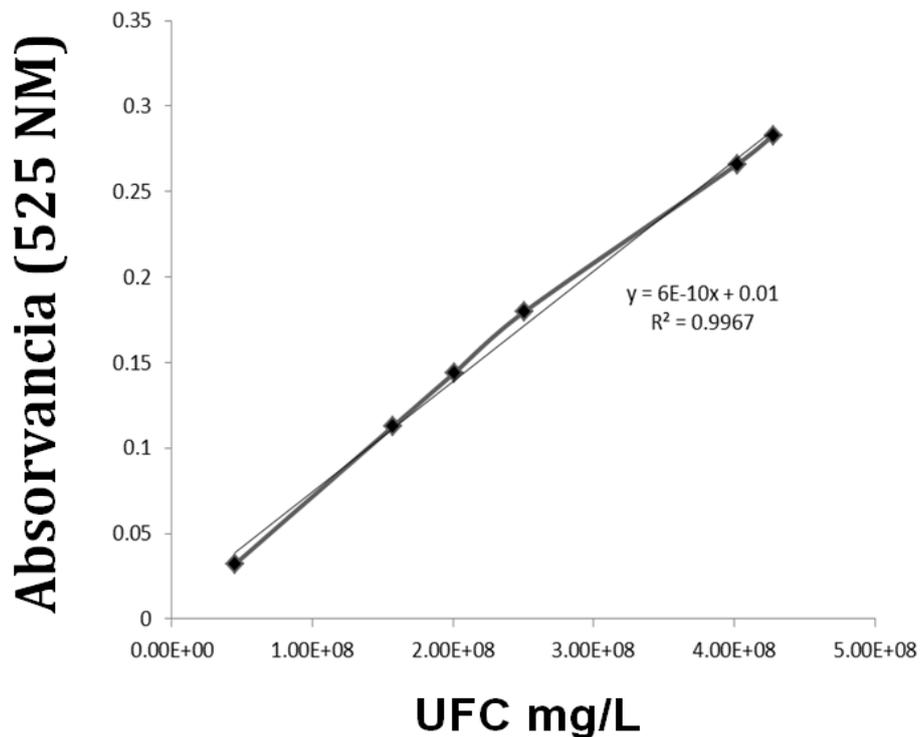
Cada 24 h se tomaron alícuotas de 5 ml para su análisis por espectroscopia UV a 525 nm (Aranda *et al.*, 2003) y recuento de bacterias viables en placas con agar nutritivo. Paralelamente, 1 ml de muestra se almacenó a -20 °C para su posterior análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD) (Agilent Series 1100, California, USA) equipado con detector de arreglo de diodo. Una columna de Lichospher 100 RP-18.5 µm (250 x 4 mm).

El pH fue ajustado a 7 en todos los casos. El medio se esterilizó en autoclave vertical (BR-25) a 121 °C durante 15 min.

#### 4.3.8.2. *Método directo de conteo de colonias por gotas*

El crecimiento de las colonias fue medido utilizando la técnica estándar de recuento en gotas desarrollada por Miles y Misra en 1983; ajustado al método de la microgota, de acuerdo a Domínguez *et al.* (2004). El conteo en placa o de colonias es un método de medición de biomasa que permite el recuento de células viables y consiste en determinar el número de células capaces de reproducirse y generar colonias sobre un medio sólido (cada célula viable da origen a una colonia).

La Figura 4.4, muestra la curva de calibración realizada que relaciona la absorbancia con las unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml).



**Figura 4.4** Curva de calibración de *Rhodococcus equi* en relación UFC/ml y Turbidez (Abs).

La medición de absorbancia es un método sencillo y más rápido que el conteo en placa pero es menos sensible y está limitado a cultivos celulares con concentraciones de  $10^8$  células/ml o mayores. Con el objetivo de la determinación de una curva de calibración representativa del sistema en estudio, los ensayos se realizaron por duplicado y cada ensayo fue analizado tres veces en forma independiente.

#### 4.3.8.3. *Rhodococcus equi* en medio líquido: Curva de crecimiento.

Para la realización de la curva de crecimiento de *Rhodococcus equi* se empleó un frasco erlenmeyer conteniendo 150 ml de medio mínimo estéril que se inoculó con una suspensión bacteriana en fase exponencial de crecimiento con una concentración suficiente para que la densidad óptica inicial a 525 nm corresponda a 0,10 ( $1.4 \times 10^8$  UFC/ml).

Posteriormente, los frascos se sometieron a agitación durante 25 días (agitación a 150 ciclos por min) a una temperatura de 28°C. Seguidamente, se analizó la evolución del crecimiento bacteriano tomando muestras de 3,5 ml de la suspensión de *Rhodococcus equi* a distintos tiempos y midiendo su densidad óptica con un Espectrofotómetro Hach 2010. Al finalizar la experiencia cinética, el cultivo fue inoculado sobre un medio sólido para asegurar la ausencia de contaminación.

La curva de tolerancia obtenida es la que se muestra en la Figura 4.4 en escalas lineal y logarítmica. A partir de esta curva, se define la afinidad de los consorcios al naftaleno más que a los otros sustratos estudiados.

Los ensayos para la determinación de las curvas de crecimiento se realizaron por duplicado y tres veces en forma independiente para diferentes concentraciones estudiadas. Con dichos datos se obtuvieron las desviaciones estándar para cada uno de los puntos de la curva de crecimiento.

#### **4.4. Resultados y Discusión**

En las cinco muestras de sedimentos de cada una de las estaciones influenciadas por diversas condiciones del entorno de la Bahía de Manzanillo, como ya fue explicado en el Capítulo 1, se aislaron aquellos microorganismos que son capaces de consumir naftaleno, pireno y fenantreno como única fuente de carbono, el aislamiento se realizó mediante dos métodos (Foght, 2001; Hernández, 1997) para aumentar las probabilidades de obtención de un consorcio microbiano.

En la etapa de enriquecimiento, la adaptación se fortalece al hacer réplicas semanales por 21 días utilizando naftaleno, fenantreno y pireno como única fuente de carbono y energía, con sus respectivos controles aeróbicos y anaeróbicos (Fogth *et al*, 2001; Hernández *et al*, 1997).

Al hacer un seguimiento de los cambios en los matraces en la tercera semana de enriquecimiento, se evidenció turbidez y cambios en las propiedades del

sustrato, al disgregarse y sedimentarse, hasta la desaparición de aproximadamente el 90% toda las partículas de color blanco, con formación de un medio completamente de color café marron.

Los cultivos sobre agar nutritivo presentaron abundante crecimiento con morfologías de colonias grandes y algunas pequeñas, irregulares, cremosas, convexas y coloración amarilla, con una característica común de tinción verdosa en todos los cultivos, permitiendo seleccionar hasta ese momento cinco morfo tipos. Este hecho, permitió seleccionar bacilos y cocobacilos Gram negativos y positivos en los cinco hábitats estudiados (Tabla 4.4).

**Tabla 4.4 Características de las cepas que se encuentran en la zona**

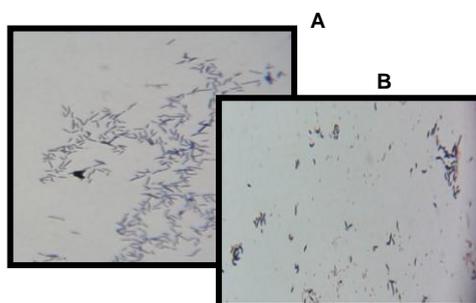
<b>CEPAS GRAM</b>	<b>MORFOLOGÍA</b>	<b>COLONIAS</b>
<b>(+)</b>	Bacilos pleomórficos	Azulado, borde entero
<b>(+)</b>	Bacilos no Esporulados	Amarillo, elevado, borde ondulado

Así mismo, los resultados de esta investigación representan un aporte al considerar que no se asemejan a lo expuesto por Ruberto *et al.* (2003) y Narváez *et al.* (2008), quienes reportaron que el grupo predominante en los aislamientos de bacterias que degradan compuestos recalcitrantes son los bacilos Gram negativos. Estas, tienen un sin número de desventajas frente a las bacterias Gram negativas, debido a que son considerados importantes degradadores de hidrocarburos por la presencia de lipopolisacaridos en su membrana, que facilitan la formación y estabilización de emulsiones de hidrocarburos en sistemas acuosos y contribuyen al incremento en la superficie de ataque del contaminante.

Al final de las transferencias sucesivas se obtuvieron cinco cepas, se identificaron las bacterias mediante la utilización de un API Coryne, de los cuales tres de las cepas pertenecían a la cepa *Rhodococcus equi* y las otras dos a la *Corynebacterium propingun*, (Figura 4.5) dos a pH 7.3 y tres a pH 6.2

con un buen crecimiento celular. En el anexo A4.1, se explica el proceso a seguir.

Los cultivos del consorcio a pH 7 después de 60 h presentaban una consistencia viscosa, también después de este tiempo aún se podía percibir un fuerte olor a naftaleno, lo cual hacía suponer una alta concentración residual (Ramírez, 1998). En las primeras 60 hrs de cultivo el consorcio presentó una coloración amarillenta posteriormente a las 100 hrs una coloración mamey y finalmente a las 400 h una coloración café marrón. A partir de allí no hubo variación alguna. En las diferentes etapas de coloración el pH final fue el mismo. Sin embargo, en unas de las muestras, presentaron una coloración amarillenta y el pH fue de 6.89, con una coloración mamey de 6.52 y con una coloración marrón de 7.02. La disminución del pH y la aparición del color puede atribuirse a la formación de intermediarios ácidos como el ácido salicílico. Mueller *et al.*, (1990) encontraron en la degradación de fluoranteno por *Pseudomonas* cambios de color durante el cultivo lo cual corresponde a la aparición de intermediarios.



**Figura 4.5. Bacterias Identificadas por medio API Coryne a) *Rhodococcus equi*, b) *Corynebacterium propinquum*.**

*Rhodococcus* se encuentra dentro de los 16 géneros descritos como actinomicetes aeróbicos de importancia médica. El género *Rhodococcus* contiene 12 especies de la cual *Rhodococcus equi* es la principal especie patógena. Este es un microorganismo productor de zoonosis, descrito en patología veterinaria desde 1923, causando neumonía granulomatosa y absceso de pulmón en potros (Camponovo y García, 2006). Sin embargo, en humanos, es un patógeno intracelular oportunista que infecta

macrófagos y polimorfonucleares, especialmente en pacientes con alteración de la inmunidad celular, tratamiento inmunosupresor y neoplasias hematológicas.

El hábitat natural de estos organismos se encuentra en la tierra y en animales de granja tales como caballos, aunque en la mayoría de los casos de infección humana (70%) no existe historia de contacto con animales (Meeuse *et al.*, 2007)

El género *Corynebacterium* fue descrito por primera vez por Lehmann y Neuman en 1896 con el objeto de acomodar al bacilo causante de la difteria y a otras especies morfológicamente parecidas. Etimológicamente, el nombre deriva de la palabra griega “koryne” que significa garrote o porra y “bacterion” que significa bastón (Barcenas *et al.*, 2006).

En la Figura 4.6, las dos bacterias encontradas, fueron incubadas en medio mínimo mineral (MMN) a iguales condiciones ambientales, demostrando mejor condición la bacteria *Rhodococcus equi*, siendo esto objeto de este estudio.

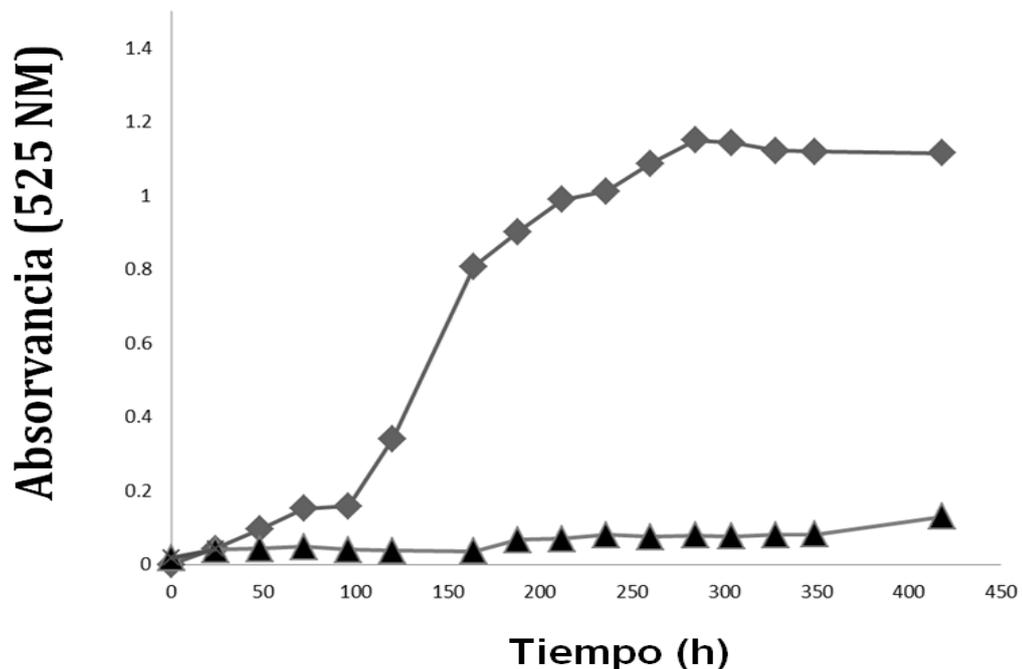
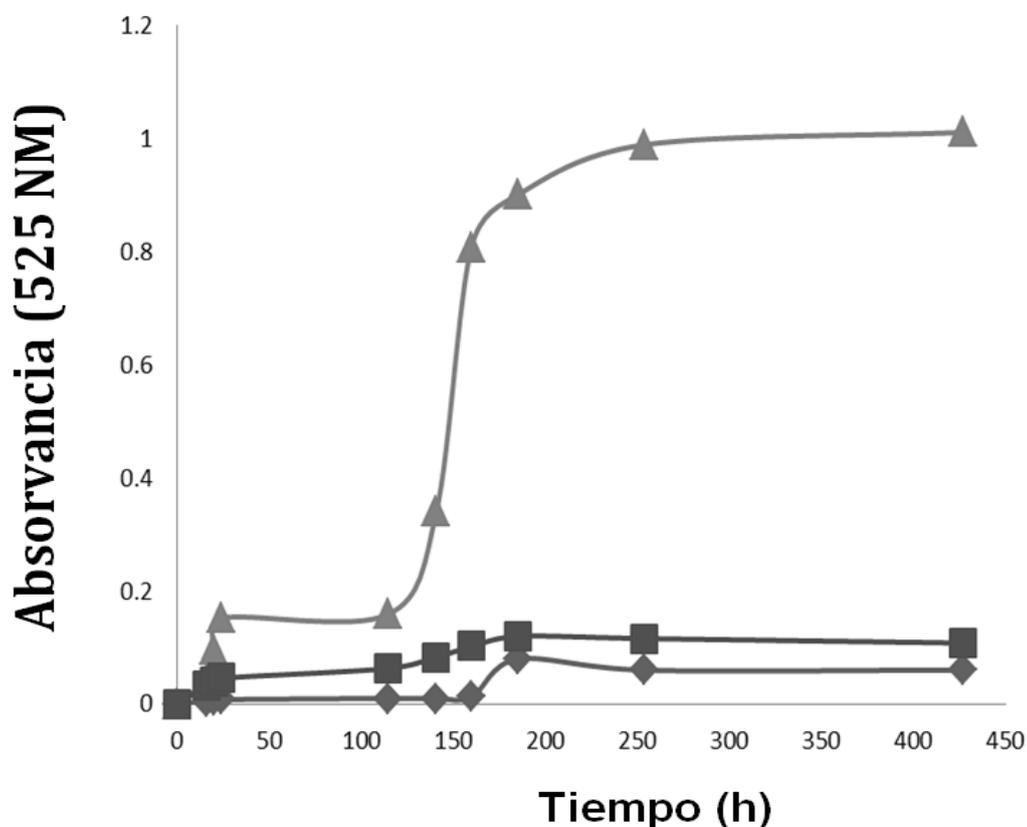


Figura 4.6. Curva de tolerancia de los microorganismos estudiados *Rhodococcus equi* (◆) y *Corynebacterium propingun* (▲).

En la Figura 4.7 se observa que los microorganismos fueron capaces de crecer exponencialmente utilizando como única fuente de carbono el naftaleno. En los casos del Pireno y Fenantreno, no hubo evidencia de crecimiento exponencial en el período estudiado (430 h). Esto coincide con resultados como los obtenidos por González et al., (2010); Haritash y Kaushik (2009); Salazar (2010) que encontraron que mientras menor es la cantidad de anillos en la molécula, mayor es la capacidad de biodegradación de las bacterias.



**Figura 4.7. Curva de tolerancia en medio líquido del consorcio bacteriano. La curva manifiesta los sustratos Pireno (♦), Naftaleno (▲) y Fenantreno (■).**

De los seis (6) bioensayos a diferentes concentraciones de naftaleno desarrollados durante el 2011, 2012 y 2013 (se presentan algunos resultados en el Anexo A4.2).

Los mejores resultados de crecimiento se presentaron en julio de 2013, y se muestran en la Figura 4.8., los cuales fueron realizadas en duplicado, para las

concentraciones de 125mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L, 750 mg/L, 1000 mg/L y 2000mg/L. Hasta 2000 mg/L, no se evidenció inhibición.

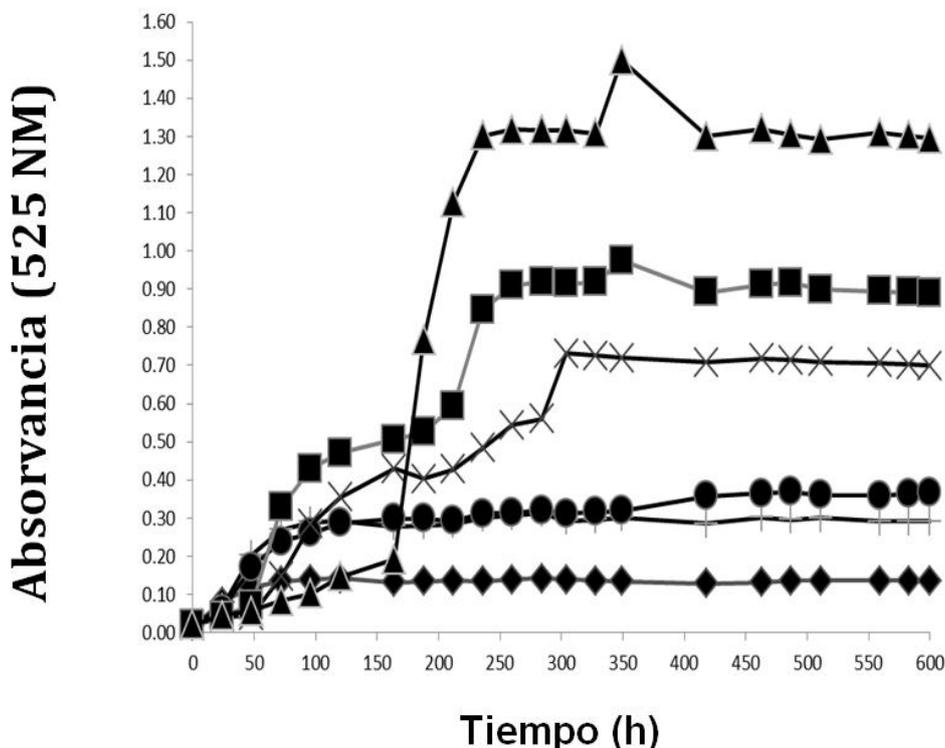


Figura 4.8. Curva de crecimiento en medio líquido del *Rhodococcus equi*. La curva manifiesta las concentraciones de naftaleno (◆) 125 mg/L, (+) 250 mg/L, (x) 500 mg/L, (●) 750 mg/L, (▲) 1000 mg/L y (■) 2000 mg/L. Septiembre 2012

Estos resultados muestran que este tipo de cepa bacteriana que se encontró en el Sedimento (*Rhodococcus equi*) tiene una buena capacidad de crecer en el sustrato de fácil asimilación; además, también es un indicativo de que contiene una población microbiana activa, lo cual es típico de zonas cercanas a descargas de aguas con alta materia orgánica (Ramirez, 1998). Sin embargo, también muestran que tiene una baja capacidad para adaptación y/o degradación de compuestos poliaromáticos de alto peso molecular como es el caso del fenantreno y pireno.

En relación con la metodología empleada en el estudio, varios autores coinciden en que la selección de microorganismos a través de pruebas sucesivas de crecimiento bacteriano en cultivos puros enriquecidos con sustratos, es considerada como una estrategia eficiente para evaluar la

adaptación y supervivencia de cepas tolerantes a elevadas concentraciones de petróleo (Mackey y Hodgkinson, 1996).

La diversidad metabólica de los miembros del género *Rhodococcus* los hace ser candidatos ideales para su utilización en bioprocesos, con un gran potencial, tanto en aplicaciones industriales como ambientales (Echeverri *et al.*, 2010).

Para modelar la cinética de crecimiento, la cual de acuerdo a autores como Mihelcic (2001) y Mihelcic *et al.* (2012) es proporcional al consumo de sustrato (en este caso naftaleno), se utilizaron las velocidades iniciales de crecimiento, que se presentaron en la Figura 4.8.

Como se observa en la Figura 4.9, ambas curvas (septiembre 2012, julio 2013) tienden a modelar la cinética de tipo Monod, sin inhibición, y llegando a una capacidad de carga, de la *Rhodococcus equi*. Sin embargo en la cinética de crecimiento de septiembre de 2012, todavía no se evidencia la llegada a la capacidad de carga.

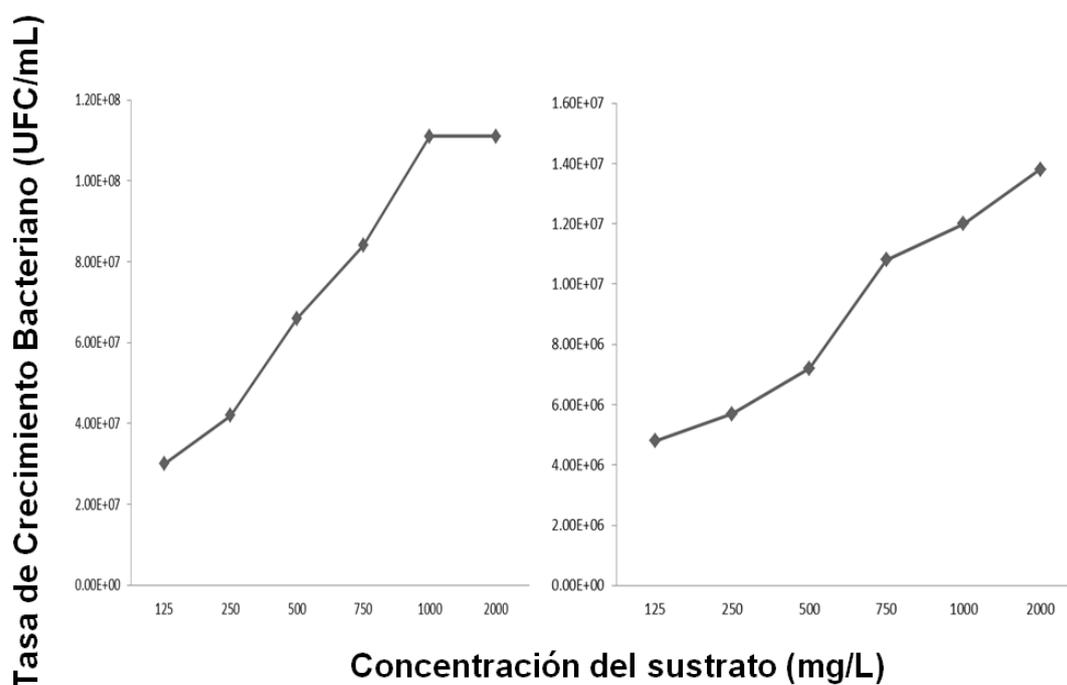


Figura 4.9. Modelo de crecimiento de la *Rhodococcus equi* correspondiente a (a) septiembre de 2012 y (b) julio de 2013

De acuerdo a la Ecuación 4.2. y en función de la Figura 4.9 se encontraron la  $\mu_{max}$ ,  $\mu_{max}/2$  y  $K_s$  (constante de saturación), para ambos períodos. La  $K_s$  refleja la capacidad de un organismo para adquirir recursos (sustrato, en este caso naftaleno en mg/L). Así, las tasas máximas de crecimiento específico ( $\mu_{max}$ ) obtenidas fueron para septiembre de 2012,  $1.38 \times 10^7$  UFC/mL/h y para julio de 2013  $1.11 \times 10^8$  UFC/mL/h. Cabe señalar que en ambos escenarios la temperatura fue de 30 °C para los ensayos de septiembre de 2012 y de 26°C para los ensayos de julio 2013.

**Tabla 4.5. Constante cinética de saturación determinada por el Modelo de Monod en la biodegradación de Naftaleno.**

Medio de la cepa	$K_s$ (mg/L)	Curva de crecimiento (CCr)/Curva de consumo(CCo)	Referencia
<i>Rhodococcus equi</i> de los sedimentos de la Bahía de Manzanillo (Panamá) septiembre 2012 ( $T^{\circ}= 30^{\circ}\text{C}$ )	458	CCr	Este estudio
<i>Rhodococcus equi</i> de los sedimentos de la Bahía de Manzanillo (Panamá) julio 2013 ( $T^{\circ}= 26^{\circ}\text{C}$ )	403	CCr	Este estudio
<i>Ralstonia eutropha</i> Aplicaciones en reactores. agosto de 2013 ( $T^{\circ}= 28^{\circ}\text{C}$ )	0.415	CCo	Jalilnejad, E. y Vahabzadeh, (2013)
<i>Staphylococcus sp.</i> Obtenida de sitios contaminados con hidrocarburos (India) enero 2013. ( $T^{\circ}= 15$ a $37^{\circ}\text{C}$ )	0.79	CCo/CCr	Navdeep, <i>et al.</i> (2013)
<i>Micrococcus sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i> Obtenida de sitios contaminados con hidrocarburos (India) febrero 2013. ( $T^{\circ}= 15$ a $41^{\circ}\text{C}$ )	2.53	CCo	Navdeep, <i>et al.</i> (2013)
<i>Gordonia alkanivorans</i> Lodo contaminado de hidrocarburos, Taiwán Diciembre 2005 ( $T^{\circ}= 30^{\circ}\text{C}$ )	2874	CCo/CCr	Young <i>et al.</i> , (2005)
<i>Pseudomonas putida</i> Análisis en suelo y su influencia con sustratos múltiples. Septiembre de 1998. ( $T^{\circ}= 30^{\circ}\text{C}$ )	0.234	CCo	Ahn, <i>et al.</i> (1998)

En la Tabla 4.5 se presentan las constantes cinéticas de biodegradación de distintos estudios, donde se demuestra la afinidad de muchos microorganismos al sustrato naftaleno utilizado como fuente de carbono única y en combinación de otros compuestos a diferentes rangos de temperatura. De acuerdo a Navdeep, *et al.* (2013), demostraron que la velocidad de crecimiento depende de la afinidad del compuesto al microorganismo, como también la influencia del tóxico y de la adición de otro compuesto como co-sustrato, lo cual es determinante en la obtención de la constante de saturación y de inhibición en el caso de Young *et al.*, (2005), la  $K_s$  fue 2874 mg/L utilizando lodo contaminado de hidrocarburo como co-sustrato. En este estudio, utilizando naftaleno como única fuente de carbono, se observó que la  $K_s$  fue mayor (458 mg/L) a la  $T^\circ$  de 30°C en relación a cuando la  $T^\circ$  fue menor de 26°C, donde la  $K_s$  tuvo un valor de 403 mg/L, esto sustenta lo encontrado por Bitton (2005); Huertas (2010); Lara (2011), que a mayores temperaturas mayor es la capacidad de un organismo de consumir un sustrato. Si existe una población tolerante a la contaminación, esta contaminación puede participar en la recuperación del equilibrio del sitio contaminado como fue reportado por (David y Raymond, 1998).

#### **4.5. Conclusiones y Recomendaciones**

A lo largo de este capítulo se logró demostrar el aislamiento, identificación de bacterias con la capacidad de crecer utilizando HAP (naftaleno), como única fuente de carbono; además, se lograron realizar ensayos de biodegradación utilizando como única fuente de carbono naftaleno, fenantreno y pireno.

En el sedimento de la Bahía de Manzanillo se encontró que las cepas *Rhodococcus equi* y *Corynebacterium propingun*, cuentan con la capacidad de degradar naftaleno como única fuente de carbono. Para el caso del fenantreno y pireno, no se evidenció crecimiento. Es importante resaltar que no se han encontrado otros estudios en los cuales el *Rhodococcus equi*, se halla utilizado como agente biodegradador de algún compuesto orgánico recalcitrante.

El *Rhodococcus equi* fue la cepa que se encontró con mayor abundancia, en relación a la *Corynebacterium propingun* (3:2).

De acuerdo a la Ecuación de Monod, se encontraron la  $\mu_{max}$ ,  $\mu_{max} / 2$  y  $K_s$  (constante de saturación), para ambos períodos. La  $K_s$  refleja la capacidad de un organismo para adquirir recursos (sustrato, en este caso naftaleno en mg/L). Así, las tasas máximas de crecimiento específico ( $\mu_{max}$ ) obtenidas fueron para septiembre de 2012,  $1.38 \times 10^7$  UFC/mL/h y para julio de 2013  $1.11 \times 10^8$  UFC/mL/h. Cabe señalar que en ambos escenarios la temperatura fue de 30 °C para los ensayos de septiembre de 2012 y de 26°C para los ensayos de julio 2013.

De los seis (6) bioensayos de crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi* utilizando como única fuente de carbono naftaleno, se presentaron los dos comportamientos de crecimiento y los dos modelos cinéticos de crecimiento más representativos (septiembre 2012 y julio 2013); obteniendo  $K_s$  de 458 mg/L a la T° de 30°C y  $K_s$  de 403 mg/L a la T° de 26°C, esto sustenta lo encontrado por Bitton (1994); Huertas (2010); Lara (2011), que a mayores temperaturas mayor es la capacidad de un organismo de consumir un sustrato.

Ante lo expuesto se recomienda analizar las cinéticas de biodegradación de naftaleno a concentraciones mayores a 2000 mg/L con la finalidad de encontrar la constante de inhibición; además, realizar bioensayos con diferentes combinaciones de hidrocarburos. Por último se deben comparar las cinéticas de cepas aisladas versus cinéticas en consorcio.

#### 4.6. Referencias Bibliográficas

[1] AHN, S., GHIORSE, C., LION, W. y SHULER, M., [1998]. Growth Kinetics of *Pseudomonas Putida* G7 on Naphthalene and occurrence of naphthalene toxicity during nutrient deprivation. *Biotechnol Bioeng.* 5;59(5):587-94.

[2] ARANDA, C., GODOY, F., BECERRA, J., BARRA, R. y MARTINEZ, M., [2003]. Aerobic secondary utilization of a nongrowth and inhibitory substrate - 2,4,6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S 37 and *Sphingopyxis*-like strain S 32. *Biodegradation* 14: 265-274.

- [3] ARULAZHAGAN, P., VASUDEVAN, N. Y YEOM, I., [2010]. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 7 (4), 639-652, Autumn 2010.
- [4] BÁRCENAS, A., CANCHOLA, V., y ARENAS, R., [2006]. Eritrasma. Revisión y actualización. *de México*, 22(2), 107.
- [5] BELLGARDT, K., [2000]. "Bioreaction Engineering", Ed. K. Schugerl, and K. H. Bellgardt, Springer Verlag, Berlin, p. 1-18; 56-72; 391-412
- [6] BITTON, G., [2005]. Wastewater microbiology. 3<sup>rd</sup> edition. Wiley Serie in Ecological and Applied Microbiology. Wiley and Sons Publications. New Jersey. P. 213-222.
- [7] BOSMA, P., MIDDELDORP, M., SCHRAA, G. y ZEHNDER, B., [1997]. Mass transfer limitation of biotransformation: Quantifying bioavailability. *Environ. Sci. Technol.* 31: 248-252.
- [8] CHIKERE, C., OKPOKWASILI, G. AND ICHIAKOR, O., [2008]. Isolation and Identification of Three-Ring Polyaromatic Hydrocarbons (Anthracene and Phenanthrene) Degrading Bacteria. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (11), pp. 2541-2544,
- [9] CAMPONOVO, R., Y GARCÍA., [2006]. *Rhodococcus equi*. *Revista chilena de infectología*, 23(2), 155-156
- [10] DÍAZ MORA, C., [2007]. Cinética bacteriana de cinco cepas degradadoras de hidrocarburos y su consorcio, en diferentes condiciones de PH y temperatura, a nivel de laboratorio y biofermentador para la producción piloto semindustrial. PEPDA, Petroproducción, campo Sacha, Ecuador 2007.

- [11] DAVIS, B. y RAYMOND, L., [1998]. Oxidation of alkyl substituted cyclic hydrocarbons by a *Nocardia* during growth on *n*-alkanes. *Appl. Microbiol.* 9:383-388
- [12] DOMÍNGUEZ, V., VIDAL, G. y MARTÍNEZ, M., [2004]. Sorptive behavior of chlorophenols on river volcanic sediment. *Bull Environ Contam Toxicol* 73:519-526.
- [13] ECHEVERRI, G., MANJARREZ, G. y CABRERA, M., [2010]. Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. *Publicación Científica en Ciencias Biomedicas - ISSN: 1794-2470 Vol.8 No. 13.*
- [14] GONZÁLEZ, R., BUSTILLOS, T., FERNÁNDEZ, M., CORTES, B., y MOROYOQUI, G., [2010]. Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Química Viva*, 9(3), 120-145.
- [15] HAIGLER, B. y SPAIN, J., [1993]. Biodegradation of 4-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain 4NT. *Applied and Environmental Microbiology.* 59 (7): 2239-2243.
- [16] HARITASH, K. Y KAUSHIK, P., [2009]. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J Hazard Mater.* 2009 Sep 30; 169(1-3):1-15.
- [17] HERNANDEZ, B., KOH, C., CHIAL, M. y FOCHT, D., [1997]. Terpene-Utilizing Isolates and their Relevance to Enhanced Biotransformation of Polychlorinated Biphenyls in Soil. *Biodegradation.* 1997; 8:153-158.
- [18] HUERTA, H., [2010]. Determinación de propiedades físicas y químicas de suelos con Mercurio en la Región de San Joaquín y su relación con el crecimiento bacteriano. Tesis de Grado. Universidad Autónoma de Querétaro. México.

[19] IZQUIERDO, A., [2003]. Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Analisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales.

[20] JALILNEJAD, E. Y VAHABZADEH, F., [2014]. Use of a packed-bed airlift reactor with net draft tube to study kinetics of naphthalene degradation by *Ralstonia eutropha*. Environmental Science and Pollution Research. March 2014, Volume 21, Issue 6, pp 4592-4604

[21] KIM, J., SU-Hyeun S., y CHOUL-Gyun L., [2005]. Degradation of Phenanthrene by Bacterial Strains Isolated from Soil in Oil Refinery Fields in Korea. *Microbiol. Biotechnol.* 15(2), 337–345.

[22] LARA, A., [2011]. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(2), 209-223

[23] LU, X., ZHANG, T., HAN-PING, H., LEUNG, K. y ZHANG, Y., [2011]. Biodegradation of naphthalene by enriched marine denitrifying bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65 (2011) 204e211.

[24] MAYA-Yescas, E., [2005]. Efecto del Tolueno en la Biodegradacion de Hidrocarburos en un Suelo Intemperizado Contaminado con Petroleo. Tesis de grado. Universidad Autónoma Metropolitana. Mexico.

[25] MACKEY, A. Y HODGKINSON, M., [1996]. Assesment of the impact of Naphthalene contamination on mangrove fauna using behavioral bioassays. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1996; 56: 279–286

[26] MEEUSE, J., SPRENGER, G., VAN ASSEN, S., LEDUC, D., DAENEN, S., ARENDS, J., y VAN DER WERF, S., [2007]. Rhodococcus equi infection after alemtuzumab therapy for T-cell prolymphocytic leukemia. *Emerging infectious diseases*, 13(12).

[27] MIHELICIC, J., [2012]. Fundamentos de Ingeniería Ambiental. Limusa Wiley. México, D.F.

[28] MIHELICIC, J., [2001]. Fundamentos de Ingeniería Ambiental. Limusa Wiley. México, D.F.

[29] MONOD, J., [1949]. "The growth of bacterial cultures". Ann. Re'. Microbiol 3 371-394.

[30] MUELLER, J., CHAPMAN, P., BLATTMANN, B. y PRITCHARD, P., [1990]. Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilllis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 56:1079-1086.

[31] NARVÁEZ-Flórez, S., GÓMEZ, M. Y MARTÍNEZ, 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(1), 61-75

[32] NAVDEEP, S., YUVNEET, R., MANINDER, K. y ASHNA, G., [2013]. The Isolation & Characterization of Several Strains of Naphthalene Degrading Bacteria obtained from oil-contaminated sites. Institute of Pharmaceutical Sciences, Dept. Of Biotechnology, Punjab Technical University, Punjab. India

[33] NORMAN, R., FRONTERA-SUAU, R. y MORRIS, P., [2002]. Variability in *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide expression during crude oil degradation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 5096-5103.

[34] ORTIZ, A., [2004]. Biodegradación de hidrocarburos en suelos: Efecto de la adición de cosubstratos gaseosos Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias. México, D.F., Febrero, 2004. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

[35] PELCZAR, M., REID, R. Y CHAN, S., [1985]. Microbiología. São Paulo: McGraw-Hill.

- [36] PLAZA, E., [2007]. Mejoramiento de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en bacterias fosfato solubilizadoras. Tesis de Maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D. C.
- [37] RAMIREZ, M., [1998]. Biodisponibilidad y Biodegradación de Naftaleno en Suelo. Tesis de grado. Universidad autónoma Metropolitana. Mexico.
- [38] RÍOS, R., [2005]. Estudio de la Estimulación Biológica para el Tratamiento de Residuos de Perforación Petrolera Empleando Lisímetros. Tesis de grado de Maestría. México D.F. Universidad Autónoma Metropolitana.
- [39] ROY, S., DIPAK, H., BISWAS, D., y KUMAR, R., [2002]. Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 18 (6): 575-581.
- [40] RUBERTO, L., VÁZQUEZ, S. y MAC CORMACK, W., [2003]. Effectiveness of the natural bacterial flora. Biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *Internat. Biodeter. Biodegr.*, 52: 115-125.
- [41] SALAZAR Ruales, C., [2010]. Evaluación de la remoción de hidrocarburos totales de petróleo, a nivel de laboratorio, mediante consorcios de microorganismos seleccionados por su capacidad degradadora, aislados de suelos y aguas contaminadas con crudo de la parroquia San Carlos, provincia de Orellana, bajo condiciones aerobias y anaerobias.
- [42] SIBILA Lores, M., [2008]. Evaluación de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de tensioactivos en el medio acuático marino.
- [43] SUTIKNOWATI, L., [2011]. Microbial community during bioremediation experimental on oil spill in coastal of Pari Island. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, Vol. 3, No. 1, Hal. 91-103

[44] TESSIER, G., [1942]. Croissance des populations bacterie'nnes et quantite'd'aliment disponible. *Revue Scienti□que Paris X*, 3208, 209–216.

[45] VAN HAMME, J., SINGH, A., y WARD, O., [2003]. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67: 503-549.

[46] WAYENS, C., [2004]. Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por *Acinetobacter* sp. y *Pseudomonas putida* para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados. Tesis de grado. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biología.

[47] WONGSA, P., TANAKA, A., HASANUZZAMAN, M., YUMOTO, I. y OKUYAMA, H., [2004]. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. *Curr. Microbiol*, 49: 415-422.

[48] YOUNG, C., CHEN, T. y SONG, M., [2005]. Identification and Kinetic Characteristics of an Indigenous Diesel-degrading *Gordonia alkanivorans* Strain *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Volume 21, Number 8-9.

[49] YUNA, T., TIANLINGA, Z. y XINHONG, W., [2002]. PAHs contamination and PAH-degrading bacteria in Xiamen Western Sea. *Chemical Speciation and Bioavailability (2002)*

[50] ZHUANG, W., TAY, J., MASZENAN, A., KRUMHOLZ, L. AND TAY, S., [2003]. Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. *Letters in Applied Microbiology* 2003, 36, 251–257

[51] ZHISONG, C., QILIANG, L., CHUNMING, D. and ZONGZE, S., [2008]. Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology (2008)* 10(8), 2138–2149

## **Capítulo V**

***Análisis de sensibilidad del proceso de biodegradación de la cepa Rhodococcus equi en función del pH, Temperatura, salinidad y velocidad de agitación. Aplicación de la Cepa en un bioreactor en continuo a escala de laboratorio.***

## **Capítulo V**

### ***Análisis de sensibilidad del proceso de biodegradación de la cepa Rhodococcus equi en función del pH, Temperatura, salinidad y velocidad de agitación. Aplicación de la Cepa en un bioreactor en continuo a escala de laboratorio.***

#### **5.1. Introducción**

Los microorganismos y los productos de su metabolismo son los componentes vivientes del suelo y del agua, y constituyen uno de los parámetros útiles para la medición de su fertilidad. Sin embargo, la medida de la actividad de estos microorganismos es difícil de evaluar debido a la compleja estructura de las comunidades que alberga y sus relaciones, sobre todo en función al ecosistema u otros factores de efecto dominante (Bitton, 2005). Ya que los microorganismos reaccionan fácil y rápidamente a estímulos ambientales, los parámetros de efectos específicos son difíciles de determinar en medio de un gran número de variables influyentes que pueden ser desconocidas o no constantes; es por ello que la varianza en los ensayos es crítica para los procesos de detección de efectos y de interpretación de datos (Ramos y Zuñiga, 2008). Según Jenkinson (1992) y Mora 2007, los factores involucrados en la actividad microbiana, tales como temperatura, pH, humedad, disponibilidad de oxígeno, nutrientes inorgánicos y accesibilidad al sustrato, influyen en la descomposición de la materia orgánica. Así también, ha sido señalado que la actividad y estabilidad de las enzimas en el suelo es regulada por muchos factores como pH (Huerta 2010; Lillo *et al.* 2011), biomasa microbiana (Zagal *et al.* 2003; Rodríguez *et al.* 2011), materia orgánica del suelo (Julca *et al.* 2006; La Manna *et al.* 2007), y el contenido de humedad del suelo (Bonilla y Cancino 2001; Nuñez *et al.* 2013). Por todo lo anteriormente mencionado en este Capítulo se ha considerado estudiar a nivel de laboratorio, cinco de los escenarios más representativos (Bitton, 2005) de cambio de cuatro variables ambientales conocidas, temperatura, salinidad, pH y velocidad de agitación que influyen en las variaciones de la actividad microbiana.

### 5.1.1. Variables que influyen en la biodegradación

En los ensayos de biodegradación intervienen diversas variables que tienen gran influencia en los resultados obtenidos tales como: los microorganismos (tipo, aclimatización y concentración), el medio de cultivo (tipo, concentración), oxígeno, temperatura, pH, luz y la concentración del sustrato como también el método analítico a utilizar (Haritash y Kaushik, 2009).

Los microorganismos utilizados en los diversos ensayos de biodegradación realmente se deben encontrar en las aguas de los ríos, agua de mar, agua residuales y en los procesos de depuración, de esta forma los resultados que se obtengan de los ensayos pueden ser extrapolados a la realidad.

La experiencia indica que los mejores resultados en los ensayos de biodegradación se obtienen con inóculos polivalentes de diferentes especies. Esto se debe a que las poblaciones mixtas proporcionan mayor información para la predicción del comportamiento del sustrato en un medio natural y real. Especies puras, son indispensables ya que se quiere aclarar los mecanismos o secuencias de reacciones de la oxidación biológica (Lechuga, 2005).

Adicional a este factor, la concentración bacteriana es un factor predominante en la biodegradabilidad ya que afecta la velocidad de degradación, el tiempo de aclimatización y por consiguiente el tiempo de degradación. Típico, cuando la relación de la bacteria en función del sustrato disminuye, el periodo de adaptación aumenta y su velocidad de degradación disminuye (Rosenkranz, 2013).

Los métodos de ensayos de biodegradabilidad suelen simular en el laboratorio las condiciones naturales, se debe utilizar en los ensayos agua de río, mar o agua residual. Sin embargo, si se quiere obtener ensayos se recomienda el uso de agua sintética a base de sustancias orgánicas que suministren los elementos necesarios (medio mineral). Puede ocurrir que dependiendo del tipo de sustrato o contaminante y la concentración del medio, las bacterias inicien su metabolismo a base de otros compuestos más asequible y no

degradar la molécula del sustrato hasta que dicho compuesto haya desaparecido prácticamente, con lo que la degradación del sustrato o contaminante se retrase sensiblemente (Sibila, 2008).

En los métodos de ensayos y estudios de biodegradación en medio aeróbico es fundamental la presencia del oxígeno libre para el desarrollo de microorganismos, que lo utilizan como agente oxidante del sustrato. En este caso, el medio se airea por agitación o por paso de una corriente de aire, en ningún caso se introduce oxígeno puro ya que afectaría el desarrollo de los microorganismos por pérdida de cantidades de anhídrido carbónico disuelto en el medio (Lechuga, 2005).

Siendo fundamental la relación entre el oxígeno disuelto disponible en el medio y el sustrato, impedir este proceso sobre todo en superficies estáticas permite que el sustrato se absorba en las paredes del matraz afectando el ensayo. Otro efecto de la falta de oxígeno en el ensayo se da en la absorción del sustrato en las membranas exteriores celulares del microorganismo afectando su permeabilidad al oxígeno (Alberola, 2008).

El intervalo y rango de temperatura en la que puede crecer el microorganismo es variado y muy amplio, sin embargo, para cada organismo este intervalo es pequeño. Un aumento de la temperatura durante el ensayo, genera una disminución del periodo de latencia o tiempo de adaptación, igualmente, influye sobre la concentración limitante, pues aunque la curva de degradación en función del tiempo sea análoga, los valores de esta concentración aumentan con la temperatura. Los ensayos de biodegradabilidad suelen estar en un rango de 20 a 25 °C (Lechuga, 2005).

En su gran mayoría, las bacterias, se adaptan y desarrollan en intervalos de pH relativamente amplios, sin embargo, existen microorganismos cuyo desarrollo se inhibe en medios alcalinos o ácido. Este criterio no tiene importancia en los ensayos ya que generalmente los mismos se realizan en medios neutros o ligeramente alcalinos ya que estos son más representativos de los medios naturales contaminados (Frioni, 1999).

Cabe destacar que se ha observado en los ensayos ciertas tendencias del medio a cambiar hacia pH ácido como consecuencia de los cambios químicos debido al desarrollo de la población bacteriana. Para cambios excesivos de pH, se añaden al medio solución tampón (Villena y Serrano, 2005).

Una influencia apreciable para el desarrollo de los microorganismos y esencial para ciertas especies de bacterias es la luz. En general, al hacer estos ensayos se realizan en la oscuridad o en luz difusa (Riverón et al. 2012)

Por otra parte una sustancia puede ser utilizada por microorganismos como sustrato, estos se desarrollan propiamente dentro de los límites específicos de concentración. En concentraciones muy bajas de sustratos, la velocidad de desarrollo es generalmente lenta, sin embargo, aumenta a medida que se incrementa su concentración (Bitton, 2005). La velocidad de crecimiento por encima de un cierto límite, esta se hace constante e independiente de la concentración.

La concentración de los sustratos utilizados son generalmente del orden de partes por millón (mg/L) y suele ser análoga o ligeramente superior a la concentración normal a valores de referencias del contaminantes en aguas marinas.

#### 5.1.2. Análisis de sensibilidad

Los bioensayos son usualmente, exámenes relativamente simples que evalúan la respuesta de los organismos de prueba bajo condiciones controladas (Chapman, 2007). Es loable tener como objetivo final el empleo de los bioensayos para proteger los ecosistemas al predecir sus respuestas y sugerimos que los bioensayos se diseñen para detectar problemas de contaminación. Debe tenerse especial cuidado en las características más comunes y la selección del tipo de ensayo, para asegurar que las concentraciones en el ambiente se mantengan constantes durante los períodos de tiempo del ensayo, y que cada cierto tiempo deben chequearse y

conocerse, así como los criterios para la selección del organismo de ensayo (Carballo *et al.* 2003).

Dichos ensayos, en bacterias y otros microorganismos, tienen la ventaja de que presentan rutas bioquímicas similares a las de los organismos superiores, ciclos de vida cortos y además responden rápidamente a los cambios en el medio ambiente (Frioni, 1999).

## **5.2. Objetivos**

Analizar la capacidad de crecimiento y potencial consumo de naftaleno del *Rhodococcus equi* bajo distintas condiciones ambientales (pH, temperatura, velocidad de agitación, salinidad).

Simular el tratamiento de las bacterias aislados en un reactor en continuo.

## **5.3. Materiales y Métodos**

### *5.3.1. Análisis de Sensibilidad*

Se realizaron diferentes escenarios combinados de los parámetros pH, temperatura, salinidad y velocidad de agitación como se muestra en la Tabla 5.1, para evaluar los cambios en las cinéticas de crecimiento. Se evaluó la actividad microbiana en agua y sedimento, encontrando a la cepa *Rhodococcus equi*, con la capacidad de biodegradar naftaleno (Capítulo 4). Con esta Cepa se estudiaron cinco (5) diferentes condiciones experimentales, correspondientes a dos distintas temperaturas, dos valores de salinidad, dos valores de pH y en dos condiciones de agitación. La prueba de bioensayos se realizó en triplicado simultáneamente. Se prepararon 15 matraces con sus respectivos controles con un volumen de 150 mL de medio mínimo a diferentes concentraciones de naftaleno (50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L). Se regularon durante 7 días los parámetros de salinidad, temperatura del medio mínimo, pH y velocidad de agitación (Tabla 5.1). El criterio utilizado para fijar los valores de los parámetros fueron el máximo y el mínimo que se puede

obtener en un medio marino promedio; en el caso de la salinidad, el mínimo que se probó fue de 0 g/L (Ramos y Zuñiga, 2008).

**Tabla 5.1 Escenarios con las diferentes variables estudiadas.**

<b>Escenarios</b>	<b>Variables evaluadas</b>			
	<b>pH</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Salinidad (g/L)</b>	<b>Velocidad de agitación (r.p.m.)</b>
No. 1	6.00	20	0	50
No. 2	6.00	30	0	150
No. 3	6.00	30	23	150
No. 4	8.00	30	23	50
No. 5	8.00	20	23	150

#### *5.3.1.1. Crecimiento bacteriano con variación de temperatura.*

Se incubó a temperaturas de 20 y 30 °C con la ayuda de una incubadora con agitación, debido a que eran las temperaturas mínimas y máximas que se podían encontrar en agua y sedimento de la Bahía de Manzanillo, de acuerdo a lo presentado en los capítulos 2 y 3 (Mora, 2007).

Para realizar el conteo microbiano se utilizó el método del micro gota como fue explicado en el Capítulo 4.

#### *5.3.1.2. Crecimiento bacteriano con variación de pH*

El pH del medio mineral fue variado con la utilización de ácido sulfúrico 1 % e hidróxido de sodio 1 % en un rango que va de 6 a 8 (Mora, 2007).

Las muestras fueron procesadas con el método de conteo de micro gota e incubadas a 30°C por 24 horas, tiempo luego del cual se procedió al conteo de colonias para su posterior reporte.

Se trabajó con medio mínimo mineral en triplicado a dos diferentes pH iniciales de 6.0 y 8.0 (Cortez, 2006), los cuales se cultivaron en frascos Erlenmeyer de 500 mL con un volumen efectivo de trabajo de 150 mL (Cortez, 2006).

#### 5.3.1.3. *Crecimiento bacteriano con variación de la Salinidad*

La salinidad se varió de acuerdo a Mille *et al.*, en 1991, con un valor máximo de 23 g/l de NaCl, y 0 g/L (asumiendo un medio de tipo continental).

#### 5.3.1.4. *Efecto de la Agitación sobre el crecimiento bacteriano*

El rol de los dispositivos de aireación colocados en los fermentadores, es de proveer a los microorganismos del oxígeno necesario para su crecimiento. Por otra parte el fin de la agitación es asegurar la uniformidad de la suspensión microbiana de manera de acelerar la rapidez de intercambio entre esta y el medio de cultivo.

La turbulencia generada por la agitación; además, permite la división de las burbujas de aire lo que aumenta la superficie de contacto y la duración de este, entre el oxígeno y los microorganismos.

Para evaluar este criterio se utilizó un agitador mecánico modelo 420 Shaker Orbital, y se experimentó 2 diferentes velocidades de agitación 50 rpm y 150 rpm (Borowitka, 1999).

Después de la determinación de los valores de pH y agitación que llevaron a los mayores valores de crecimiento se evaluó la actividad microbiana en el sedimento en 5 diferentes condiciones experimentales, correspondientes a dos distintas temperaturas, dos condiciones de agitación, a tres valores de pH y a dos condiciones de salinidad (Tabla 5.1).

5.3.2. Simulación de un Bioreactor en continuo utilizando como sustrato agua de refinería con naftaleno y la cepa *Rhodococcus equi*.

En base a lo realizado en el Capítulo 4 y la primera parte del presente capítulo Arenas y Pérez (2014) adaptaron un reactor biológico en continuo a escala de laboratorio para probar la eficiencia de la cepa *Rhodococcus equi* en el consumo de DQO, DBO y naftaleno, utilizando agua artificial de refinería la cual contenía naftaleno, bajo condiciones monitoreadas de pH, Temperatura, Sólidos, crecimiento bacteriano en UFC/mL.

En la Figura 5.1 se muestra el Esquema del diseño experimental del reactor biológico en continuo a escala de laboratorio.

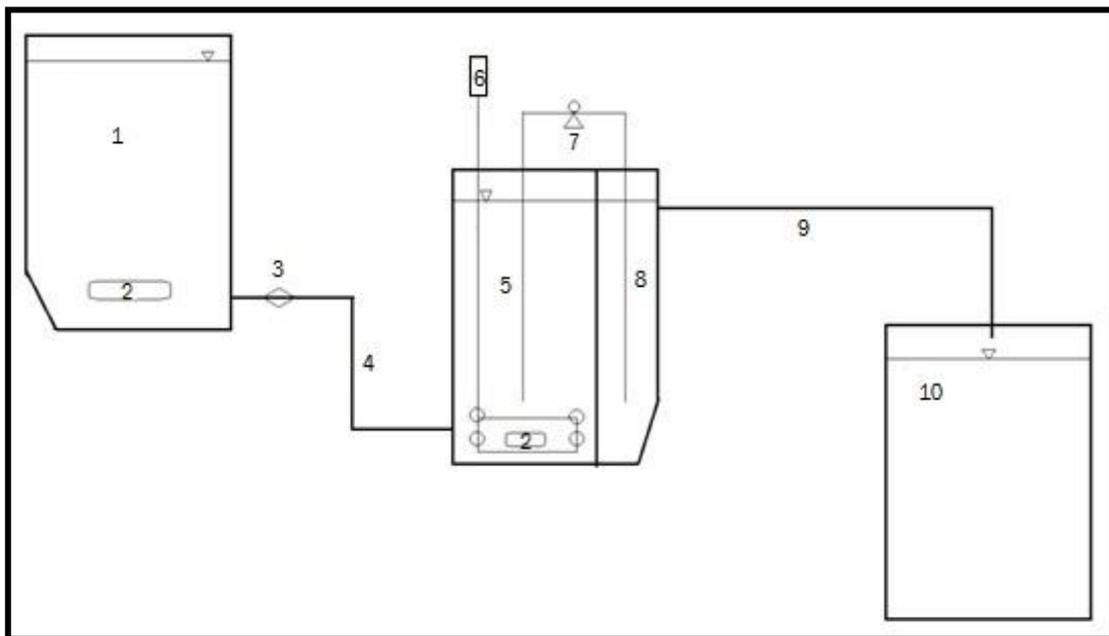
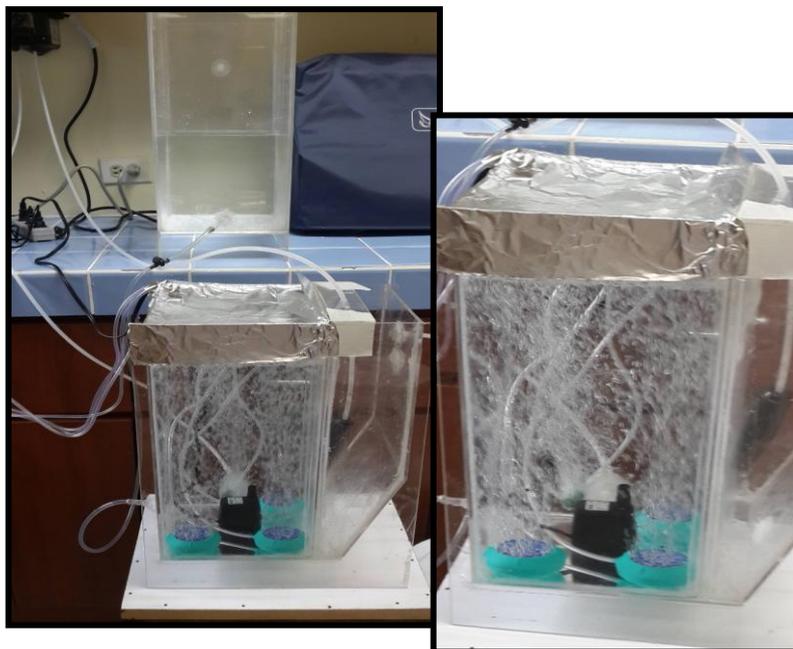


Figura 5.1. Esquema del diseño experimental utilizado en la investigación. Descripción:  
1. Tanque de afluente, 2. Bomba sumergible, 3. Llave reguladora de caudal 4. Tubo de entrada de caudal 5. Reactor, 6. Bomba Aireadora, 7. Bomba de recirculación, 8. Sedimentador, 9. Tubo de salida de efluente, 10. Tanque del efluente (Arenas y Pérez, 2014)

La Figura 5.2 muestra las fotos del sistema artificial montado por Arenas y Pérez (2014).



**Figura 5.2 Adición de 15 ml de bacterias en 8 litros de agua artificial en la sección del reactor.**

Las fases de prueba se dividieron en dos (2) etapas, la primera la cual duro un periodo aproximado de doce (12) días, donde el tiempo de retención que se les dio a la bacteria para que hicieran el trabajo de degradación fue de veinticuatro horas (1 día), y la segunda fase también alrededor de quince (15) días con un tiempo de retención de cuarenta y ocho horas (2 días). Las muestras fueron recolectadas en cada fase al finalizar cada tiempo de retención estipulado, para realizar diferentes pruebas, como lo son: temperatura, potencial de hidrógeno, Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Bioquímica de Degradación (DBO), Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV), Sólidos Disueltos Totales (SDT), entre otras. Para el análisis de la muestras se utilizó la guía del Standard Methods (1980). El naftaleno se analizó por cromatografía líquida (HPLC).

## 5.4. Resultados y discusión

### 5.4.1. Análisis de sensibilidad

Los valores de los diferentes escenarios (Tabla 5.1) bajo distintas condiciones de pH, Temperatura, salinidad y velocidad de agitación, para determinar el comportamiento de la cepa *Rhodococcus equi*, se presentan en la Figura 5.1. Los resultados muestran el promedio de los ensayos en triplicado.

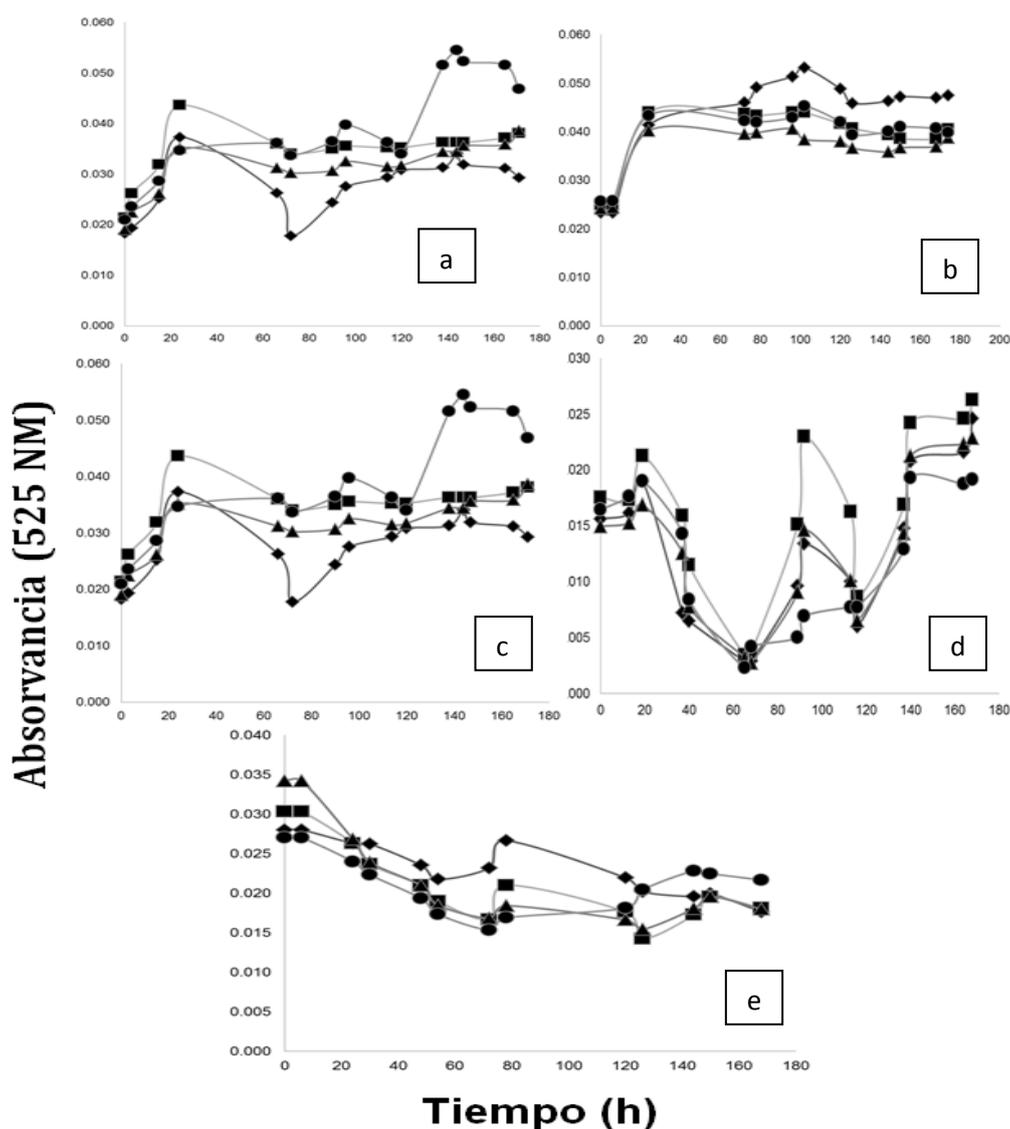


Figura 5.3. Escenarios de las variables ambientales sobre el crecimiento de la *Rhodococcus equi* a diferentes concentraciones 50 mg/L (◆), 100 mg/L (▲), 150 mg/L (■) y 200 mg/L (●). Las estaciones están representadas E1 (a), E2 (b), E3 (c), E4 (d), E5 (e).

Analizando la Figura 5.3 se pueden resaltar aspectos relevantes de estos ensayos, los escenarios más representativos de crecimiento de la bacteria *Rhodococcus equi* fueron los manifestados en los escenarios 2 y 3, donde solo fue modificado el pH y la salinidad. Esto demuestra que en condiciones de baja y alta salinidad como también a un pH de 6 se adapta rápidamente a estos ambientes. Cabe señalar, que la agitación jugó un papel importante en estos dos escenarios.

En los escenarios 4 y 5, es evidente el efecto de la temperatura y la agitación sobre la bacteria; sin embargo, en las primeras 100 horas el comportamiento fue atípico y semejante a la fase logarítmica. La aclimatización de esta bacteria fue bastante larga y se demuestra que estos dos aspectos ambientales generan un impacto significativo sobre el crecimiento bacteriano.

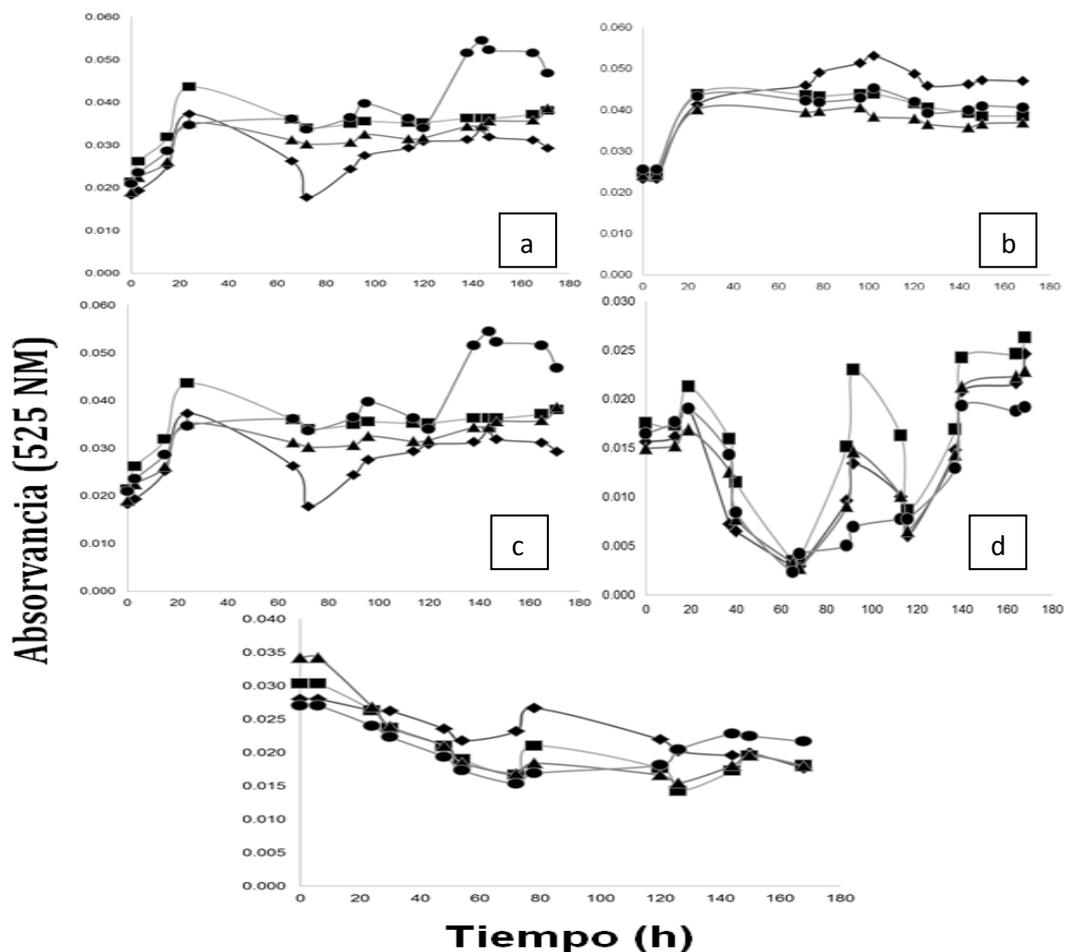


Figura 5.4. Efecto de la Temperatura sobre el crecimiento de la Bacteria *Rhodococcus equi*. Escenario 1 ( \_ ), Escenario 2 (▲), Escenario 3 (◆), Escenario 4 (■) y Escenario 5 (●). Las concentraciones están representadas 50 mg/L (a), 100 mg/L (b), 150 mg/L (c), 200 mg/L (d).

En la Figura 5.4 cabe destacar que se evidenció que en el escenario 3, la fase logarítmica fue constante en cada concentración del sustrato e inició entre 40 a 50 horas, mientras que en el escenario 2, dicha fase se dio en las primeras 10 horas del ensayo. Sin embargo, en el escenario 4, en ningunos de los ensayo se registro evidencia de desarrollo de esta fase. La fase exponencial fue más evidente en el escenario 3 donde existen las mejores condiciones aparentemente para el crecimiento de este microorganismo desarrollándose esta fase entre 50 y 100 horas. El escenario 2 mostró una fase exponencial baja que estuvo entre 10 y 15 horas pero mostró una mayor fase estacional de la bacteria bajo todas las concentraciones. Estos Resultados concuerda con los presentados por González *et al.* (2013), Las curvas de crecimiento de las bacteria a diferente concentraciones y temperaturas mostraron fase de retardo, fase exponencial y en algunos casos, la parte inicial de la fase estacionaria.

Cuando el proceso de biodegradación se desarrolló a 30 °C, en todas las cepas se alcanzó la fase exponencial, mientras que, a 20 °C la fase de retardo se extendió entre 60 y 80 horas (González et al. 2013)

El escenario 1 y 5 (Figura 5.4), donde se presentó la temperatura baja de los ensayos, los resultados muestran que en el escenario 5, en las distintas concentraciones, no hubo evidencia de una fase logarítmica claramente definida, sin embargo, en la concentración de 50 ppm se registró un comportamiento atípico que no fue correspondiente a las otras concentraciones. Cabe señalar, que no solo la temperatura baja de estos ensayos, sino también a temperatura alta se dio el mismo comportamiento a esa misma concentración.

Los resultados evidenciaron que la temperatura mínima redujo el metabolismo y el comportamiento en los cultivos se vio reflejado en un mayor tiempo de aclimatación, siendo el metabolismo microbiano más lento. Estos resultados concuerdan con los presentados por Mohn y Stewart (2000) y Ericksson *et al.* 2001, que manifestaron que la temperatura es otro factor de gran influencia en las propiedades de los HAP y en el metabolismo de los microorganismos involucrados en este proceso demostrando que la biodegradación de HAP es

posible a temperaturas bajas, con temperaturas moderadas (entre 20 °C y 30 °C), el proceso es más eficiente.

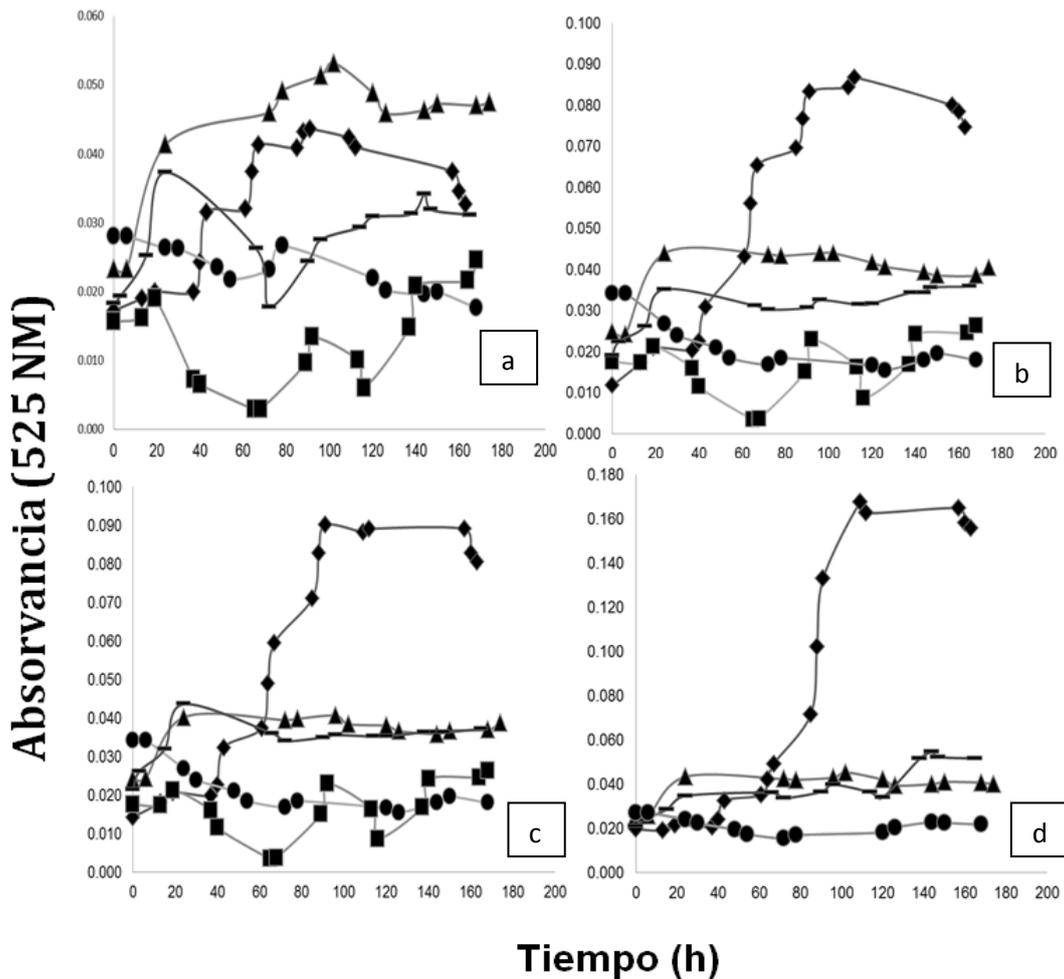
Posiblemente esto sea lo que sucedió en los cultivos a 20°C, en ambos experimentos, cuando la temperatura *in situ* en Bahía se encontraba entre 26 a 28.4°C, con una diferencia entre 2-4°C, entre el medio natural y las condiciones de cultivo de laboratorio (Mora 2007). Esto podría implicar que en las fechas de muestreo la bacteria con crecimiento óptimo entre 26-28°C, no estaban completamente representadas y que al momento del inóculo solo aquellos escenarios que contenían otras condiciones ambientales, pudieron adaptarse al cambio de temperatura de aclimatación, sean las que representen a la comunidad.

La respuesta que tuvo la bacteria que estuvo a la temperatura de 20°C creciendo más lentamente, concuerda con los resultados de Felip *et al.*, (1996) y Bitton (2005), quienes encuentran que las bacterias cultivadas a bajas temperaturas (10-20°C) muestran una tasa de crecimiento más baja y con menor abundancia máxima que las mismas bacterias creciendo a 26°C. Además encuentran que el enriquecimiento del medio de cultivo no promueve el crecimiento a bajas temperaturas.

Numerosos trabajos señalan que la temperatura óptima a que se da la degradación de los hidrocarburos es de 20 a 30°C (Atlas y Bartha, 2002), en el caso de la bacteria estudiada se pudo comprobar que se encuentran dentro de este rango.

*Rhodococcus equi*, presenta un crecimiento significativo en todas las concentraciones a una temperatura de 30°C, siendo esta por lo tanto la óptima para su crecimiento, donde se pudo registrar el mayor crecimiento en la fase estacionaria determinada anteriormente y correspondiente a las horas 50 y 168; además, tiene un comportamiento similar entre ellas se observó un crecimiento significativamente alto con un exponente máximo de  $10^9$ .

A pH ligeramente ácido (6), cercano a las condiciones neutras se observó un crecimiento significativo de *Rhodococcus equi*. Cabe señalar que ambos pH estudiados en nuestros ensayos representa pH ligeramente ácidos o ligeramente alcalinos y por ende se pudo demostrar o evidenciar crecimiento en condiciones alcalinas o acidas (Figura 5.5).



**Figura 5.5. Efecto del pH sobre el crecimiento de la Bacteria *Rhodococcus equi*. Escenario 1 (□), Escenario 2 (△), Escenario 3 (◇), Escenario 4 (■) y Escenario 5 (●). Las concentraciones están representadas 50 mg/L (a), 100 mg/L (b), 150 mg/L (c), 200 mg/L (d).**

El pH del medio es por lo general modificado por los microorganismos contenidos en este. Según las fuentes de energía disponibles y su metabolismo, el medio puede acidificarse o alcalinizarse. El pH puede disminuir si existe un metabolismo que genere ácidos orgánicos como en el caso de la metabolización de los hidrocarburos puede aumentar si se produce

amoníaco tras el consumo de aminoácidos (Prescott; Harley; Klein, 2002). Lo que explica porque conforme pasa el tiempo, el crecimiento aumenta o disminuye dependiendo de las variaciones de pH.

En la Figura 5.5 los escenarios 2, 3 y 5, donde se presentaba un pH neutro en el escenario 3 y en el 3 y 5, se presentó un crecimiento atípico donde no se distingue ningunas de las etapas del crecimiento. Esto hace evidente que otro u otros factores ambientales guardan correlación en este escenario. Sin embargo, está directamente relacionado con la temperatura del ensayo (20 °C). También se destaca que el efecto de un pH neutro alcalino tiene un importante impacto sobre esta bacteria produciéndole una larga fase estacionaria sin importar las otras condiciones del entorno (Bracho *et al.* 2004). Cabe señalar, y de acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos, que el *Rhodococcus equi* es sensible a pH mayores o iguales de 8 y se adapta y fácilmente en pH neutro y neutro ácidos (6 a 7).

En la Figura 5.5 se observa que a un pH bajo en los escenarios 1 y 2, ligeramente ácido (6), los resultados mostraron una variabilidad solo en la concentración de 50 ppm, en las demás concentraciones hubo una tendencia de crecimiento con una fase logarítmica dentro de las 10 primeras horas del ensayo, una fase exponencial dentro de las 15 horas siguientes lo que deja una larga fase estacionaria entre 30 a 160 horas. De esta manera se evidencia el impacto que tiene el pH sobre el crecimiento bacteriano en condiciones ambientales.

En las pruebas realizadas a la *Rhodococcus equi* se observó un rango de crecimiento importante que va desde pH 6 a 7, muestran un crecimiento significativo únicamente a pH 7, tanto al inicio como al final de la fase de máximo crecimiento y se observó que al darse una variación mínima del pH del medio el crecimiento decae esta ser no significativo.

Las pruebas de pH realizadas en un rango de 6 a 8 dieron como resultado en *Rhodococcus equi*, un crecimiento siendo 6 el óptimo. La comparación entre las distintas concentraciones y escenarios implica que se presentan un

comportamiento inusual dentro del experimento, ya que su crecimiento varió con respecto al tiempo dentro un mismo pH, lo que debe ser tomado en cuenta en estudios futuros ya que puede llegar a ser un factor determinante en el proceso de degradación y monitoreo del mismo.

Con todas las pruebas concluidas se pudo observar que el crecimiento significativo es predominante a pH 6, las concentraciones que presentan su mayor crecimiento entre las horas 30 y 60 de incubación tienen un comportamiento similar entre ellas, presentando un rango de crecimiento exponencial de  $10^7$  hasta  $10^9$ .

Los estudios realizados con bacterias degradadoras señalan que en el rango de pH de 5,2 a 7,0 se produce la mineralización del hidrocarburo, siendo el pH óptimo 6,0 (Bracho *et al.* 2004). Lo último que fue comprobado en esta investigación.

Se observó una alta afinidad a la salinidad en bajas y altas concentraciones de acuerdo a los ensayos estudiados del *Rhodococcus equi* en los escenarios 3, 4 y 5. En los escenarios 4 y 5, los resultados mostraron una disminución en la curva de crecimiento que puede estar influenciado por un aumento o disminución de la temperatura como también de la agitación que serian las condiciones ambientales variantes en estos escenarios. Sin embargo, presumiblemente, no se dio variación en el escenario 3, debido a que está influenciada por las condiciones óptimas ambientales y de ahí la separación entre las pendientes (Figura 5.6).

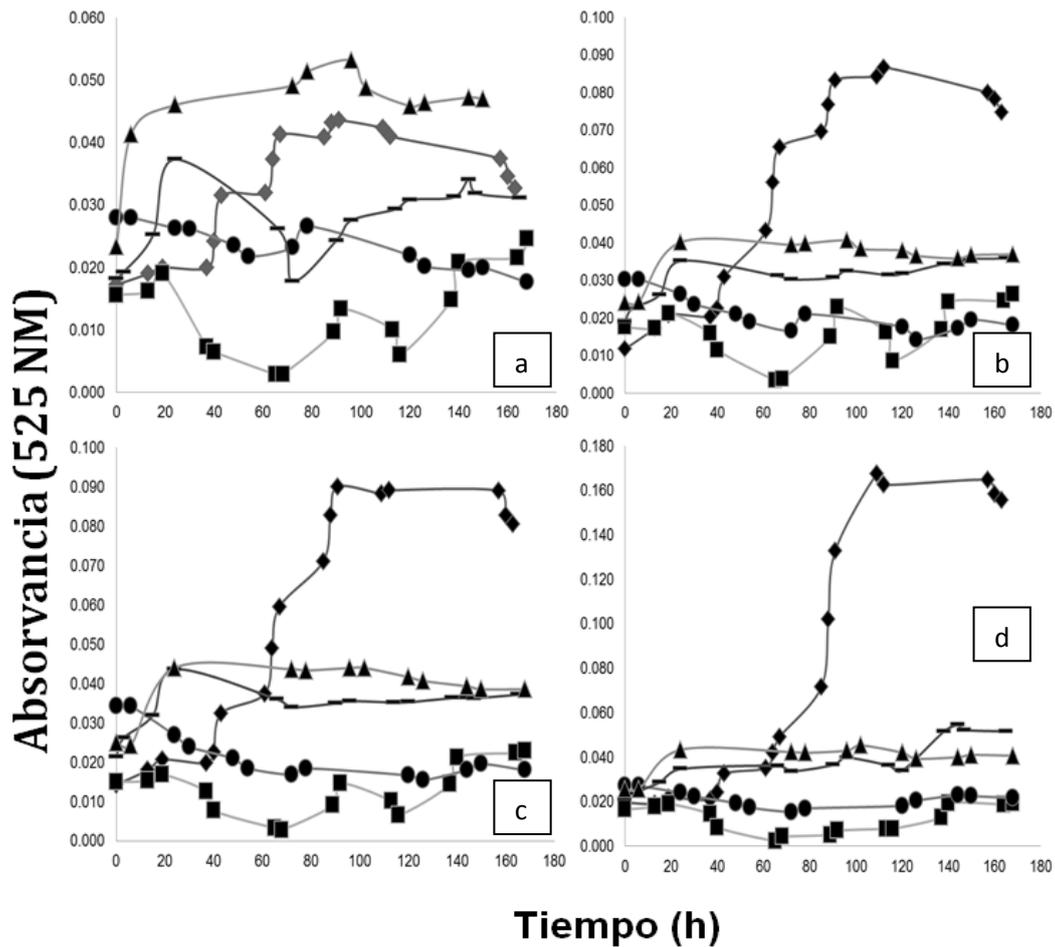


Figura 5.6. Efecto de la Salinidad sobre el crecimiento de la Bacteria *Rhodococcus equi*. Escenario 1 (□), Escenario 2 (▲), Escenario 3 (◆), Escenario 4 (■) y Escenario 5 (●). Las concentraciones están representadas 50 mg/L (a), 100 mg/L (b), 150 mg/L (c), 200 mg/L (d).

De acuerdo a los resultados, la *Rhodococcus equi*, en condiciones de salinidad normal, su crecimiento está relacionado directamente con el pH e inversamente proporcional a la temperatura y a la agitación (Mora, 2007). Indistintamente a la temperatura y a la agitación dentro del rango estudiado, el *Rhodococcus equi*, presenta marcado crecimiento y el mismo está influenciado por el pH que representa un parámetro importante para su crecimiento.

En condiciones de baja o ausencia de salinidad presentados en los escenarios 1 y 2, los resultados mostraron crecimientos demostrado por un aumento de la fase exponencial marcada entre las primeras 20 horas del ensayo y de igual forma como en todos los ensayos una prolongada fase exponencial.

Por otra parte el fin de la agitación es asegurar la uniformidad de la suspensión microbiana de manera de acelerar la rapidez de intercambio entre esta y el medio de cultivo (Bracho *et al.* 2004). También incrementó la velocidad de transferencia de nutrientes del medio, mejoró la homogenización y aumentó el recuento de entre dos y tres unidades logarítmicas respecto a los que no recibieron el tratamiento (Figura 5.5).

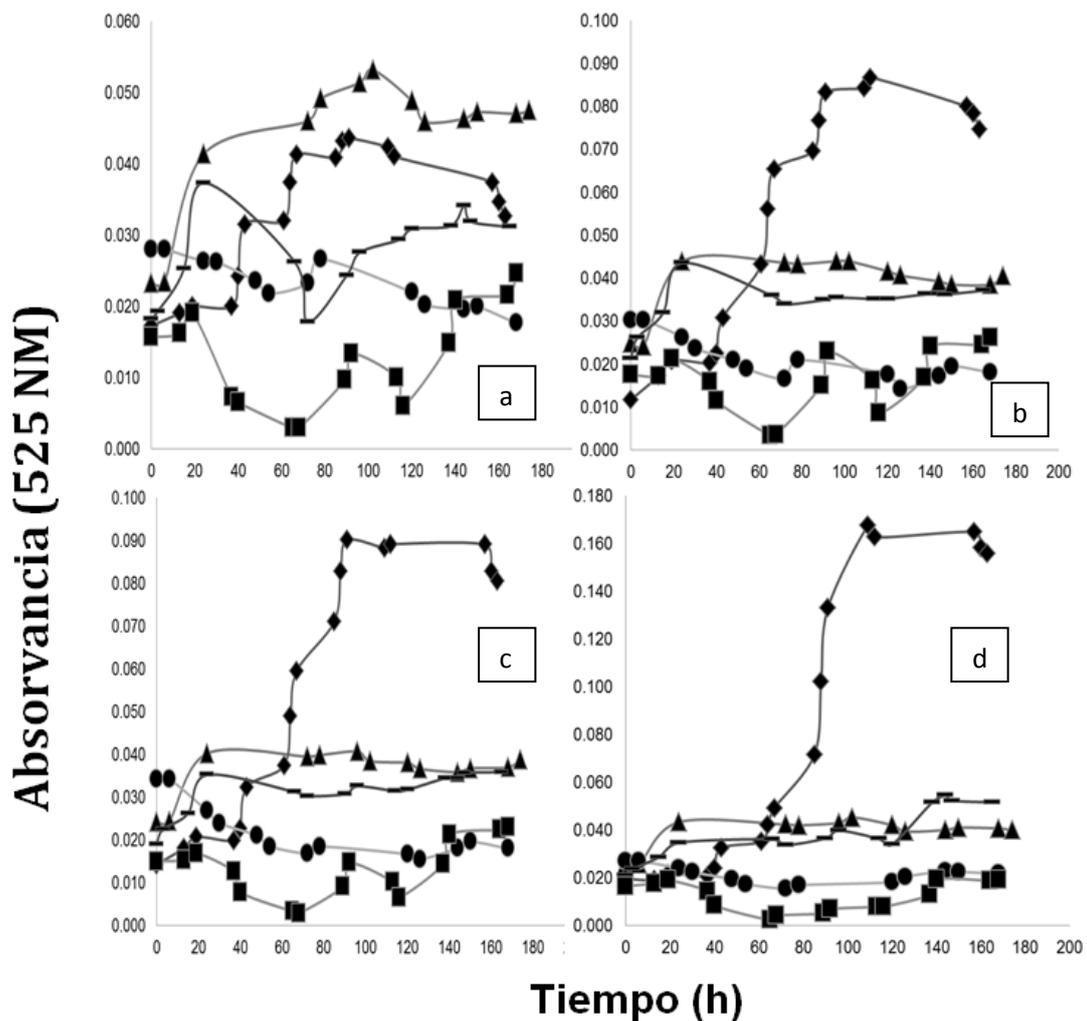


Figura 5.5. Efecto de la agitación sobre el crecimiento de la Bacteria *Rhodococcus equi*. Escenario 1 (□), Escenario 2 (△), Escenario 3 (◇), Escenario 4 (■) y Escenario 5 (●). Las concentraciones están representadas 50 mg/L (a), 100 mg/L (b), 150 mg/L (c), 200 mg/L (d).

En la Grafica 5.5, presenta un periodo de adaptación prolongado, donde se percibe condiciones desfavorables que representaba el cultivo previo, por ende, en este lapso de tiempo se forman las enzimas y los metabolitos intermedios

hasta alcanzar las concentraciones necesarias para reiniciar el crecimiento. La agitación juega un papel fundamental en la inhibición del crecimiento ya que produce la suspensión de partículas e homogenización de los nutrientes que favorece en crecimiento y la adaptación de los microorganismos (Real, 2007).

En las condiciones estudiadas a agitación mínima, resulta que las células sean genéticamente incapaces de sobrevivir, por lo que sólo unas cuantas mutantes podrán subsistir, y obviamente se requerirá más tiempo para que éstas se multipliquen lo suficiente y sea notorio el aumento de células (Rojas, 2010).

Cabe destacar que la realización de curvas de crecimiento es indispensable en cualquier estudio cinético, y en el presente sirvió para determinar los tiempos de generación, dentro de los cuales la fase de crecimiento exponencial de cada una de las cepas y del consorcio formado, tiempo en el cual se realizó las respectivas pruebas de pH y temperatura. La velocidad de crecimiento fue calculada haciendo uso de la ecuación de Monod (Monod, 1949), en la que se asume que el crecimiento es un proceso continuo y que la masa celular se produce durante la utilización del sustrato (Figura 5.6).

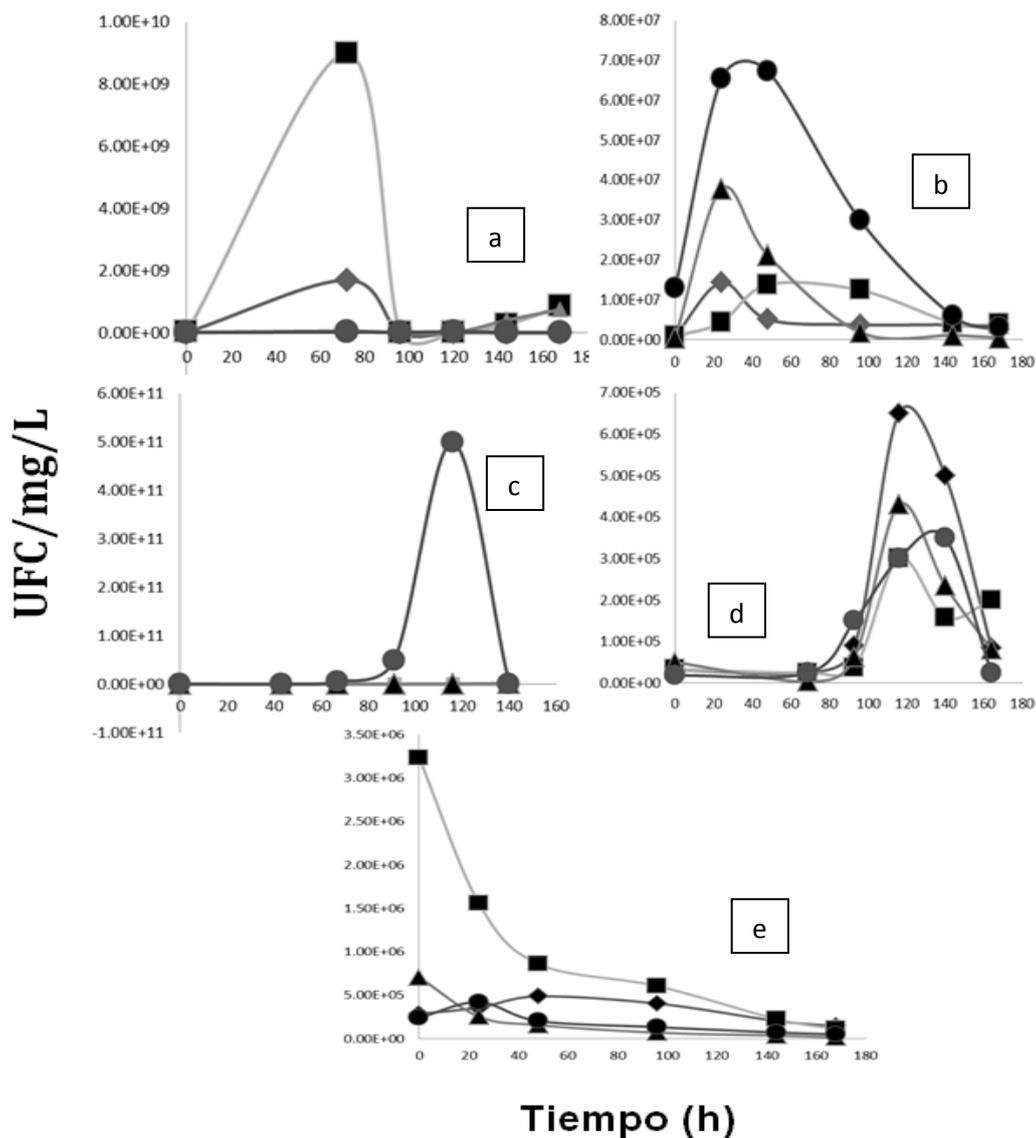


Figura 5.6. Crecimiento de la Bacteria *Rhodococcus equi*. A diferentes concentraciones 50 mg/L (◆), 100 mg/L (■), 150 mg/L (▲) y 200 mg/L (●). Las estaciones están representadas E1 (a), E2 (b), E3 (c), E4 (d), E5 (e).

Como se observa en la Figura 5.7, las tres curvas de los escenarios 1, 2 y 3; tienden a modelar la cinética de tipo Monod, sin inhibición y sin fases de adaptación, ni estacionaria, de la *Rhodococcus equi*. Sin embargo en las cinéticas de crecimiento de los escenarios 1, 2 y 3, todavía no se evidencia la llegada a la capacidad de carga. Por otra parte no se mostró crecimiento en los escenarios 4 y 5.

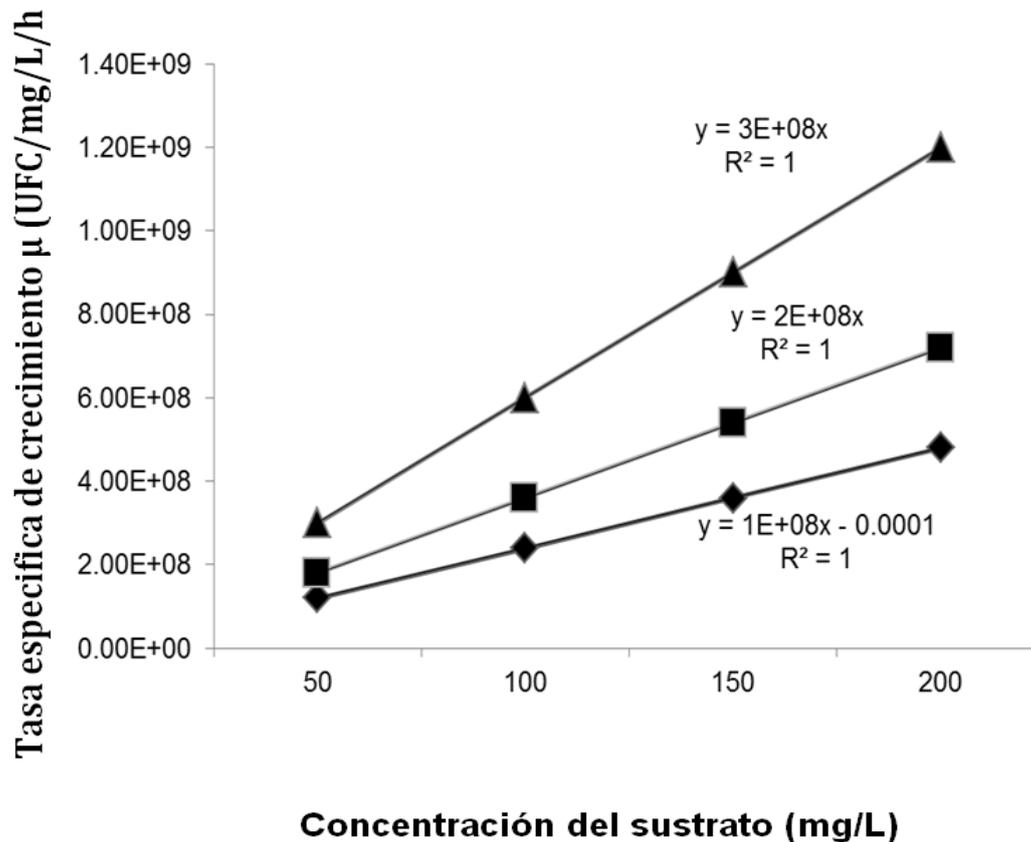


Figura 5.7. Modelo de crecimiento de la *Rhodococcus equi* en los Escenarios más representativos. Escenario 1 (■), Escenario 2 (▲) y Escenario 3 (◆)

De acuerdo a la Figura 5.7 debido a que se manejaron concentraciones muy bajas no se halló el  $\mu_{max}$ ,  $\mu_{max} / 2$  y  $K_s$  (constante de saturación), para las estaciones presentadas. Sin embargo, esto se debe a que en sistemas, como plantas de tratamiento, las cargas con que se trabajan son muy bajas (Chang *et al.*, 2014) en relación con las que se analizaron en el Capítulo 4, donde se buscaron constantes de inhibición y hasta los 2000 mg/L, no se encontraron. En función de la pendiente, cabe señalar que el mejor escenario fue el número 3 donde se encontraban los rangos adecuados para el crecimiento bacteriano.

La relación entre la tasa de crecimiento específico y la temperatura y/o el sustrato ha sido documentada por diferentes autores, los cuales coinciden en que la tasa de crecimiento es controlada por uno o bien ambos parámetros (Felip *et al.*, 1996; Church *et al.* 2000). Bell y Ahlgren (1987) también encuentran una tasa de crecimiento específico influenciada directamente por la

temperatura ( $>20^{\circ}\text{C}$ ) en donde el incremento de la tasa específica es exponencialmente dependiente de la temperatura.

Mostraron en el caso de *Aeromonas hydrophila* un crecimiento significativo a  $30$  y  $35^{\circ}\text{C}$ , siendo este último el más alto y considerado como óptimo para esta cepa; sin embargo, debe tomarse en cuenta el crecimiento a  $30^{\circ}\text{C}$ , que es también muy significativo (Mora, 2007).

En el caso de la curva correspondiente se pueden diferenciar varias fases de crecimiento exponencial como fases de latencia, esta condición pudo deberse a la interacción propia de las variables ambientales, además de la competencia propia por los microorganismos en el medio.

La realización de pruebas de crecimiento con variaciones de temperaturas ayudó al establecimiento de una condición óptima de crecimiento que en el caso de *Rhodococcus equi* es de  $30^{\circ}\text{C}$ .

Para constatar la degradación, se tomó una muestra del escenario 3, se inyectó en un cromatógrafo, con sus respectivos blanco, y se demostró que a condiciones normales la *Rhodococcus equi*, no solo tiene la capacidad de crecer en dicho sustrato, sino también de consumir el naftaleno como única fuente de carbono. En el anexo 5, A5.1 se presenta otro resultados sobre este ensayo.

#### 5.4.2. Simulación de degradación en un Reactor en continuo

En el escenario 1, se logró observar que el crecimiento de la cepa bacteriana tomó una respuesta positiva a la alimentación del reactor con carga orgánica (en términos de la DQO) y naftaleno obteniendo crecimientos de hasta aproximadamente ocho órdenes de magnitud mayor ( $6 \text{ E}+13$ ) en UFC/mL, en relación a la inoculada ( $7,85 \text{ E}+6$ ), esto bajo una temperatura de  $23.57^{\circ}\text{C}$  y un pH de 6.71 (Figura 5.8).

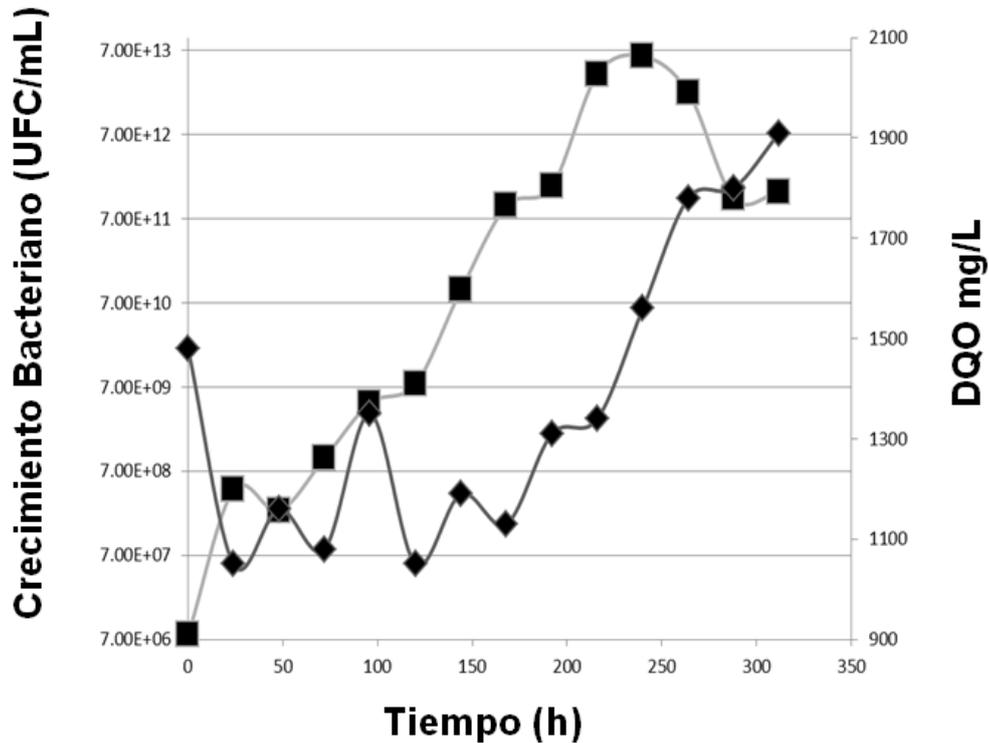


Figura 5.8. Relación de la DQO con respecto al crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi*. (Escenario 1), DQO (■) y UFC/mg/L (◆).

En la Figura 5.8, se presenta la relación entre la DQO y el Crecimiento bacteriano en función del tiempo, en el reactor. Después de las 24 primeras horas se observa como a medida que aumenta la DQO, los microorganismos van creciendo, Kiely (1999) lo explica de la siguiente forma: la DQO biodegradable se metaboliza rápidamente y parte de ella se transforma en nuevas células, al mismo tiempo existe una pérdida de biomasa viva denominada pérdida de masa endógena, donde algunos de los microorganismos emplean como alimento su propio material alimenticio almacenado o células ya muertas. Cabe señalar, que el mayor crecimiento de la bacteria *Rhodococcus equi* es a las 240 horas, lo cual también se ve influenciado por la recirculación del lodo del reactor (7 ml/min)

Mientras que en el Escenario 2, se observó un crecimiento mucho mayor al del Escenario 1. La inoculación fue de  $3.00E+9$  UFC/mL y el máximo crecimiento en este escenario fue de  $2.17E+11$  UFC/mL (Figura 5.7).

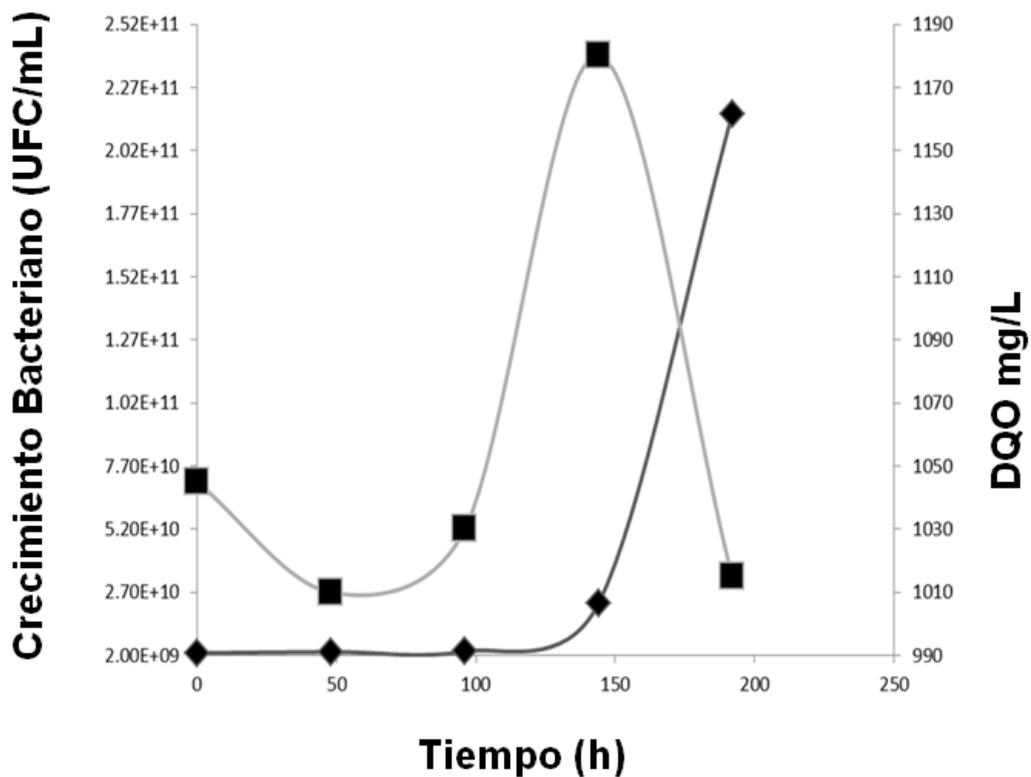


Figura 5.9. Relación DQO con respecto al crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi* en el reactor. (Escenario 2), DQO (■) y UFC/mg/L (◆).

Cabe destacar, Figura 5.9, la DQO logra metabolizarse, y parte de ella pasa a formar nuevas células, lo cual provoca que la velocidad de crecimiento en las UFC aumente. Por otra parte, existe una pérdida de biomasa viva denominada pérdida de masa endógena, donde algunos de los microorganismos emplean como alimento su propio material alimenticio almacenado o células ya muertas (Kiely, 1999). Debe mencionarse que en el periodo en estudio no se observa la capacidad de carga del sistema; pero si se observa el máximo crecimiento a las 192 horas.

Se pudo comprobar la eficiencia de degradación de naftaleno de la cepa *Rhodococcus equi*, a la salida del reactor en relación con la entrada al mismo, logrando el 100 % de consumo del hidrocarburo, la máxima eficiencia de degradación en DQO fue 36,44% y en DBO fue 66,19%, esto se da cuando el tiempo de retención hidráulica en el reactor es mayor, como fue el caso de Escenario 2, donde el TRH fue de 48 horas (Tabla 5.2 y 5.3).

**Tabla 5.2. Eficiencia en el Escenario 1.**

Periodo	DQO (mg/L) Reactor	DQO (mg/L) Salida (24 horas)	Eficiencia	DBO (mg/L) Reactor	DBO (mg/L) Salida (24 horas)	Eficiencia
1	1480	1210	18,4%	950	820	11,33%
2	1050	870	17,14%			
3	1160	1020	12,07%	800	740	7,50%
4	1080	990	8,33%			
5	1350	1140	15,56%			
6	1050	980	6,67%			
7	1190	1060	10,92%			
8	1130	990	12,39%	800	700	12,50%
9	1310	1150	12,21%			
10	1340	1170	12,69%	740	520	27,78%
11	1560	1330	14,74%			
12	1780	1640	7,87%			
13	1800	1660	7,78%			
14	1910	1710	10,47%	1466	966	34,10 %

Se puede observar en los resultados obtenidos que la bacteria aislada, *Rhodococcus equi*, es capaz de bajar la Demanda Química de Oxígeno en presencia del hidrocarburo naftaleno, coincidiendo con los resultados obtenidos por Chang *et al.* (2014) que obtuvieron altas eficiencias de degradación (58%) en presencia de naftaleno, con la diferencia de que trabajaron con consorcios bacterianos.

En el Escenario 2, se hicieron un total de 5 ensayos, los cuales tuvieron una duración de 192 horas, durando cada ensayo 48 horas, en la Tabla 5.3 se muestran los valores de eficiencia del sistema en el Escenario 2, los cuales fueron obtenidos comparando los valores de DQO y DBO tanto de la entrada como la salida para cada uno de los 5 ensayos.

Mientras que los porcentajes de eficiencias en el Escenario 1 (Tabla 5.2) fueron menores en comparación con el Escenario 2 (Tabla 5.3). De esta manera se

comprueba que al aumentar el tiempo de retención hidráulico, aumenta la eficiencia de la Cepa de realizar su trabajo de degradación en el reactor.

**Tabla 5.3. Eficiencia en el Escenario 2.**

Ensayo	DQO (mg/l) - Reactor	DQO (mg/l) – Salida	Eficiencia DQO (mg/L)	DBO (mg/L) - Reactor	DBO (mg/L) - Salida	Eficiencia DBO (mg/L)
1	1045	820	21,53%	640	225	64,84%
2	1010	650	35,64%	662,5	224	66,19%
3	1030	840	18,45%	655	350	46,56%
4	1180	750	36,44%	642	460	28,35%
5	1015	710	30,05%	587	475	19,80%

Por otra parte se recomienda comprobar la eficiencia de degradación, de la cepa *Rhodococcus equi*, tomando otros tiempo de retención hidráulica y caudales de entrada. Analizar el desempeño de la Cepa con otros Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. También es favorable realizar otros estudios en los cuales se ensaye la eficiencia de degradación de la Cepa, en función de cambios en los parámetros de diseño del reactor en continuo; además, de trabajar con una combinación de cepas, para aumentar la Eficiencia de Biodegradación de Naftaleno y otros Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Se deben continuar estudios sobre el aislamiento e identificación de especies nativas en sitios contaminados. En el anexo A5.2 se presenta los resultados de la cromatografía que constata que la degradación del naftaleno por la cepa *Rhodococcus equi*.

## **5.5. Conclusión y Recomendaciones**

Se logró comprobar la sensibilidad de la cepa *Rhodococcus equi* a los cambios de temperatura, pH, salinidad y velocidad de agitación. Y también su capacidad de degradar naftaleno; y además, materia orgánica (DBO5 y DQO5) en un reactor en continuo a escala de laboratorio.

Los datos experimentales de este trabajo, donde las condiciones fueron controladas permitieron mostrar la respuesta fisiológica esperada, al separar el efecto del sustrato.

Se desconoce hasta donde las diferencias metodológicas enmascaran la verdadera relación entre la eficiencia de crecimiento y la temperatura de la revisión bibliográfica efectuada, donde los errores inherentes a la determinación de la producción de biomasa y la respiración generan un amplio intervalo de valores de eficiencia de crecimiento.

De los cinco (5) bioensayos de crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi* utilizando como única fuente de carbono naftaleno, se presentaron los dos comportamientos de crecimiento y los tres modelos cinéticos de crecimiento más representativos (escenario 1, 2 y 3) y de acuerdo a la Figura 5.7 debido a que se manejaron concentraciones muy bajas no se halló la  $\mu_{max}$ ,  $\mu_{max} / 2$  y  $K_s$  (constante de saturación), para las estaciones presentadas. Sin embargo, esto se debe a que en sistemas, como plantas de tratamiento, las cargas con que se trabajan son muy bajas (Chang *et al.*, 2014) en relación con las que se analizaron en el Capítulo 4, donde se buscaron constantes de inhibición y hasta los 2000 mg/L, no se encontraron. En función de la pendiente, cabe señalar que el mejor escenario fue el número 3 donde se encontraban los rangos adecuados para el crecimiento bacteriano.

La eficiencia de degradación de la cepa *Rhodococcus equi* en un reactor en continuo, a escala de laboratorio, se comprobó a través de dos escenarios, el primero con un tiempo de retención de 24 horas y el segundo con un tiempo de retención hidráulico de 48 horas. En el escenario 1, se logró observar que el crecimiento de la cepa bacteriana tomó una respuesta positiva a la alimentación del reactor con carga orgánica (en términos de la DQO) y naftaleno obteniendo crecimientos de hasta aproximadamente ocho órdenes de magnitud mayor ( $6 \text{ E}+13$ ) en UFC/mL, en relación a la inoculada ( $7,85 \text{ E}+6$ ), esto bajo una temperatura de  $23,57 \text{ }^\circ\text{C}$  y un pH de 6.71. Mientras que en el escenario 2, se observó un crecimiento mucho mayor al del escenario 1. La inoculación fue de  $3.00\text{E}+9$  UFC/mL y el máximo crecimiento en este escenario fue de  $2.17\text{E}+11$  UFC/mL.

Se pudo comprobar la eficiencia de degradación de naftaleno de la cepa *Rhodococcus equi*, a la salida del reactor en relación con la entrada al mismo, logrando el 100 % de consumo del hidrocarburo, la máxima eficiencia de degradación en DQO fue 36,44% y en DBO fue 66,19%, esto se da cuando el tiempo de retención hidráulica en el reactor es mayor, como fue el caso de escenario 2, donde el tiempo de retención hidráulica (TRH) fue de 48 horas. Mientras que los porcentajes de eficiencias en el escenario 1 fueron menores en comparación con el escenario 2. De esta manera se comprueba que al aumentar el tiempo de retención hidráulico, aumenta la eficiencia de la cepa de realizar su trabajo de degradación en el reactor.

Con la cromatografía se pudo detectar, la presencia de Naftaleno en el reactor, mientras que en las muestras de salidas no se detectó. Esto comprueba que el proceso de biodegradación de la cepa fue efectivo.

La *Rhodococcus equi*, cepa bacteriana seleccionada para este estudio, se considera apta para ser utilizada en futuras pruebas y estudios que permitan generar tecnologías de biorremediación apropiadas para el tratamiento de las aguas residuales contaminadas con Hidrocarburos en nuestro país aguas

Las recomendaciones están basadas en comprobar la eficiencia de degradación, de la cepa *Rhodococcus equi*, tomando otros tiempo de retención hidráulica y caudales de entrada, realizar investigaciones con otros Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, con el objetivo de comprobar la capacidad de degradación de la cepa *Rhodococcus equi*, realizar otros estudios en los cuales se ensaye la eficiencia de degradación de la Cepa, en función de cambios en los parámetros de diseño del reactor en continuo, realizar estudios con una combinación de cepas, para aumentar la Eficiencia de Biodegradación de Naftaleno y otros Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos y continuar con estudios sobre el aislamiento e identificación de especies nativas en sitios contaminados, especialmente por hidrocarburos, como el Canal de Panamá y áreas adyacentes; de forma tal de poder potenciar la capacidad de

degradación de la combinación de cepas nativas en sistemas de tratamiento biológico y biorremediación de sitios contaminados.

## 5.6. Referencias Bibliográficas

[1] ARENAS, L. Y PERÉZ, A., [2014]. Eficiencia de degradación de DQO y naftaleno utilizando la especie *Rhodococcus equi*, en un reactor en continuo a escala de laboratorio. Tesis para optar por el Título de Ingeniería Ambiental. Facultad de Ingeniería Civil. Universidad Tecnológica de Panamá.

[2] ALBEROLA, O., PÉREZ, S., Y RODRÍGUEZ, M., [2008]. Depuración de aguas contaminadas con tóxicos persistentes mediante combinación de fotocatalisis solar y oxidación biológica. Editorial CIEMAT.

[3] ATLAS, R. y BARTHA, R., (2002). Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Cuarta Edición. Editorial Pearson Educación, SA. Madrid. 677 p

[4] BELL, R. T., AHLENG, I., [1987]. Thymidine incorporation and microbial respiration in the surface sediment of a hypereutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* 32(2):476- 482.

[5] BITTON, G., [2005]. Wastewater microbiology. 3<sup>rd</sup> edition. Wiley Serie in Ecological and Applied Microbiology. Wiley and Sons Publications. New Jersey. P. 213-222.

[6] BONILLA, C. Y CANCINO, J., [2001]. Estimación del contenido de humedad del suelo mediante el empleo de funciones de pedotransferencia. *Agricultura Técnica*, 61(3), 326-338.

[7] BOROWITZKA, W., [1999]. In Chemicals from Microalgae, Z. Cohen Ed. (Taylor y Francis Ltd).

[8] BRACHO, M., DÍAZ, L. y SOTO, M., [2004]. Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado Zulia, Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 38 (3).

[9] CARBALLO, O., ARENCIBIA, G., CONCEPCIÓN, J. y ISLA, M., [2003]. Los Bioensayos de Toxicidad en Sedimentos Marinos 1 Centro de Investigaciones Pesqueras. 5ta Ave. Y 248, Barlovento, C. Habana. Cuba.

[10] CHANG, Y.; CHENG, H.; LAI, S. y NING, H., [2014]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, volumen 86: 272-277. "Biodegradation of naphthalene in the oil refinery wastewater by enriched activated sludge"

[11] CHAPMAN, M., [2007]. Determining when contamination is pollution – Weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environmental International* 33: 492-501.

[12] CHURCH, M. J.; HUTCHINS, D. A. y DUCKLOW, H. W., [2000]. Limitation of bacterial growth by dissolved organic matter and iron in the Southern Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:455-466.

[13] CORTES, D., y OVALLE, O., [2006]. Evaluación del pH y la Agitación del medio más adecuada para el crecimiento de *Dunadiella salina* en condiciones de laboratorio.

[14] Del REAL, J., [2007]. Evaluación y modelado de la cinética anaerobia de vinaza de la Industria Alcohólica. Tesis Doctoral. Universidad autónoma del Estado de Hidalgo. México.

[15] DÍAZ MORA, C., [2007]. Cinética bacteriana de cinco cepas degradadoras de hidrocarburos y su consorcio, en diferentes condiciones de PH y temperatura, a nivel de laboratorio y biofermentador para la producción piloto semindustrial. PEPDA, Petroproducción, campo Sacha, Ecuador 2007.

[16] ERICKSSON, M., JONG, K. y MOHN, W., [2001]. Appl. Environ. Microbiol. 2001, 67,5107–5112.

[17] FELIP, M.; PACE, M. L. y COLE, J. J., [1996]. Regulation of planktonic bacterial growth rates: the effects of temperature and resources. *Microbiol. Ecol.* 31:15-28.

[18] FRIONI, L., [1999]. *Procesos microbianos*. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto.

[19] GONZÁLEZ, N., BAUTISTA, L., MOLINA, C., SIMARRO, R., VARGAS, C. y FLORES, R., [2013]. Efecto de la concentración de surfactante y de la temperatura en la biodegradación de naftaleno, antraceno y fenantreno por *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Stenotrophomonas* sp. Aislados de un consorcio degradador de HAP. *An. Quím.* 2013, 109(3), 182–187

[20] HARITASH, K. Y KAUSHIK, P., [2009]. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J Hazard Mater.* 2009 Sep 30; 169(1-3):1-15.

[21] HUERTA, H., [2010]. Determinación de propiedades físicas y químicas de suelos con mercurio en la Región de San Joaquín, Qro., y su relación con el crecimiento bacteriano. Tesis de grado. Campus Juriquilla Querétaro, Qro. Septiembre del 2010, México.

[22] JENKINSON, D., [1992]. La Materia Orgánica del Suelo: Evolución. En: Wild A. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas. Madrid. Mundi Prensa.

[23] JULCA, A., MENESES, L., BLAS, R., Y BELLO, S., [2006]. La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. *Idesia (Arica)*, 24(1), 49-61.

- [24] KIELY, G., [1999]. Ingeniería Ambiental. Fundamentos, entornos, tecnologías y sistemas de gestión. McGraw-Hill. Interamericana de España, S.A. Aravaca, Madrid.
- [25] LA MANNA, L., BUDUBA, C., ALONSO, V., DAVEL, M., PUENTES, C., Y IRISARRI, J., [2007]. Comparación de métodos analíticos para la determinación de materia orgánica en suelos de la región Andino-Patagónica: efectos de la vegetación y el tipo de suelo. *Ciencia del suelo*, 25(2), 179-188.
- [26] LECHUGA, M., [2013]. Biodegradación y Toxicidad de Tensoactivos Comerciales. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Octubre 2013.
- [27] LILLO, A., RAMÍREZ, H., REYES, F., OJEDA, N. Y ALVEAR, M., [2011]. Actividad biológica del suelo de bosque templado en un transecto altitudinal, Parque Nacional Conguillío (38° S), Chile. Universidad de La Frontera, Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración, Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales. Temuco, Chile.
- [28] MILLE, G.; ALMALLAH, M.; BIANCHI, M.; WAMBEKE, F. Y BERTRAND, J. C., [1991]. Effect of salinity on petroleum biodegradation. *Fresenius J Anal Chem* 339: 788-791.
- [29] MOHN, W. y STEWART, R., [2000]. *Soil Biol. Biochem.* 2000, 32, 1161–1172. 7.
- [30] MONOD, J., [1949]. The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.* pp. 371 - 394
- [31] MORA, J., [2007]. La actividad microbiana: un indicador integral de la calidad del suelo. Doctorado de la universidad nacional de Colombia.
- [32] NUÑEZ, A., RUIZ, M., CHUK, D. y ROSSINI, B., [2013]. Determinación de perfiles de humedad en suelos homogéneos a través de un método geoelectrico. *Cienc. suelo* [online]. 2013, vol.31, n.2.

- [33] PRESCOTT, L., HARLEY, J. y KLEIN, D., [2004]. Microbiology. Fundamentals of applied microbiology; 2:1012-4.
- [34] RAMOS, E. Y ZÚÑIGA, E., [2007]. Efecto de la Humedad, Temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú.
- [35] RIVERÓN, E., RAMÍEZ, N., HERRERA, D., BARRERAS, G., ZAYAS, M. y REGUEIRO, Á., [2012]. Estación de trabajo para el estudio de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* mediante el método de turbidez. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 43(2), 1-5.
- [36] RODRIGUEZ, N., CORONADO, H., TORRES, D., y ZAMORA, F., [2011]. Changes in microbial biomass, soils respiration and germination of onion (*Allium cepa* L.) after application of Oxyfluorfen, Fluazifop and Pendimethalin in an entisol of Falcon State.
- [37] ROJAS, G., [2010]. Evaluación del efecto del agua proveniente de las fosas saed-3, saed-2 y am-42 en la planta de inyección de agua salada del campo Santa Ana área mayor anaco (ama) Distrito Gas Anaco”. Tesis de grado. Universidad de Oriente, Barcelona. España.
- [38] ROSENFRAZ, F., [2013]. Estudio del Comportamiento de reactores anaerobios de tipo ASBR frente a compuestos de difícil degradación y/o efectores negativos. Tesis Doctoral. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Chile.
- [39] SIBILA, A., [2008]. Evaluación de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de tensioactivos en el medio acuático marino.
- [40] VILLENA, L., Y SERRANO, F., 2005]. Biodegradación y toxicidad de tensioactivos comerciales.

[41] ZAGAL, E., RODRÍGUEZ, N., VIDAL. I. Y MAUREIRA, N., [2003]. Biomasa microbiana por los métodos reactivo nitrógeno ninhydrina y absorbancia ultravioleta ( $uv_{280}$ ) en distintos sistemas de cultivo. Universidad de Concepción Facultad de Agronomía, Departamento de Suelos, Casilla 537, Chillán, Chile. R.C. Suelo Nutr. Veg. 3 (1) 2003 (17-28).

**A2.1. Resumen del Anteproyecto de Norma de Calidad de Aguas Marina Costera**  
**Preparado para: ANAM/DINAPROCA**  
**Preparado por: URS Holdings, Inc**  
**Panamá – Julio de 2006**

**CONSIDERANDO:**

Que de conformidad a lo establecido en el artículo 309 de la Constitución Política de la República de Panamá de 1972, Reformada por los Actos Reformatorios de 1978, por el Acto Constitucional de 1983 y Los Actos Legislativos 1 de 1983 y 2 de 1994, se establece, “A la Autoridad del Canal de Panamá corresponde la responsabilidad por la administración, mantenimiento, uso y conservación de los recursos hidráulicos de la cuenca hidrográfica del Canal de Panamá, constituidos por el agua de, los lagos y sus corrientes tributarías, en coordinación con los organismos estatales que la Ley determine.”

Que la Calidad de las aguas marinas y costeras en la República de Panamá se han visto afectadas debido a la contaminación por los desechos provenientes de las actividades antropogénicas, tales como vertimientos de aguas residuales con insuficiente o ningún tratamiento, el uso indiscriminado de agroquímicos, hidrocarburos y otros agentes contaminantes. Por tal motivo el Consejo Nacional del Ambiente aprueba el Programa Trienal de Normas (período 2001-2003), mediante la Resolución No 003-01 de 19 de julio de 2001, en el cual se incluye entre las normas priorizadas la de Calidad de Aguas Marinas y Recursos Marinos y Costeros.

**CAPITULO III**

**DE LAS NORMAS DE CALIDAD, DEL MUESTREO Y ANÁLISIS DE MUESTRAS**

**Artículo 7: Disposiciones Generales**

a) La Dirección General de Recursos Marino y Costeros u organismo equivalente tendrá la responsabilidad de realizar la toma y análisis de muestras en el territorio nacional a excepción de las áreas marinas costeras protegidas cuya responsabilidad recaerá sobre la Autoridad Nacional del Ambiente. La AMP y ANAM a través de sus departamentos responsables del muestreo y análisis podrán contratar a un laboratorio comercial o de investigación estatal o privado debidamente

acreditado para la realización de estos muestreos. De no existir laboratorios acreditados, se podrá contratar a un laboratorio debidamente autorizado por el MICI, hasta tanto existan laboratorios acreditados.

### Artículo 8: Requisitos de Calidad

Los requisitos de calidad permisibles para las aguas marinas y costeras destinadas para uso recreativo mediante contacto directo o indirecto son los siguientes

Requisitos de Calidad Parámetros	Unidades	Valor	Métodos
pH		6.0 – 9.0	SM4500-H /EPA 150.1
Oxígeno Disuelto	mg/l	>4.0	SM4500-OG/EPA 360.1
Turbiedad	NTU	<25.0	SM2130B/EPA 180.1
Transparencia	m	±10% <sup>(1)</sup>	Disco Secchi
Color	Pt-Co	<25.0	SM2120B/EPA 110.2
Sólidos Sedimentables	mg/l	<5.0	SM2540F/EPA160.5
Sólidos Disueltos	mg/l	<35,000	SM2540C/EPA 160.1
Sólidos Suspendidos	mg/l	<50.0	SM2540C/EPA160.2
Sólidos Totales	mg/l	<36,000	SM2540C/EPA 160.3
Olor	TON	No Perceptible	SM2150B/EPA140.1
<b>Compuestos inorgánicos y metales</b>			
Cianuros	mg/l	<0.02	SM4500CN /EPA352.2/ EPA335.2 335.3-
Nitrógeno Amoniacal	mg/l	<0.50	SM4500NH3-H /EPA 350.1
Detergentes	mg/l	<0.50	SM5540C/EPA425.1
Arsénico	mg/l	< 0.05	SM3500As/SM3120B /EPA 200.9
Estaño (Sn)	mg/l	<0.5	SM3111B/SM3112B/ EPA 236.1 <sup>2</sup>
Cromo (Cr)	mg/l	<0.05	SM5540C/EPA 218.2
Cadmio (Cd)	mg/l	<0.005	SM 3120 B/EPA 213.2
Plomo (Pb)	mg/l	<0.01	SM 3120 B/EPA 200.7
Zinc (Zn)	mg/l	<1.00	SM5540C/EPA 200.7
Hierro (Fe)	mg/l	<0.50	SM3111B/EPA 200.7 <sup>2</sup>
Mercurio (Hg)	mg/l	<0.001	SM3111B/EPA 245.1 <sup>2</sup>
<b>Parámetros Biológicos y Bioquímicos</b>			
Enterococos	NMP /	<50	EPA1106.1
Coliformes Totales	NMP /	<500	EPA 1604
Coliformes Fecales	NMP /	<50	SM9221E/SM9222E
Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg/l	<2	SM5210B/ 405.1
<b>Compuestos Orgánicos</b>			
Aceites y Grasas	mg/l	<0.50	SM 5520C/ SM 5520D/EPA

**Tabla**

			1664/ EPA 413.1	<b>1</b>
Hidrocarburos Totales de Petróleo	mg/l	<0.05	SM 5520 F/EPA 1664	
Plaguicidas Organoclorados	mg/l	<0.005	SM 6630B/ SM 6630 C/ SM 6630D/EPA	
Plaguicidas Órganofosforados	mg/l	<0.005	EPA 614/8141	

**Tabla 3**

Condiciones de Toma de Muestras por Parámetro	Lugar de Análisis	Envase	Volumen Recomendado de Muestra	Preservación	Tiempo
<b>Características Físicas y Químicas</b>					
pH	Terreno	P o V	--	--	--
Oxígeno Disuelto	Terreno o Laboratorio	P o V	1000 ml	Enfriar 4°C, mantener en oscuridad	24 horas
Turbiedad	Terreno o Laboratorio	P o V	1000 ml	Resuspender en el laboratorio	--
Transparencia	Terreno	--	--	--	--
Color	Laboratorio	P o V	1000 ml	Sin preservativo	24 horas
Sólidos Sedimentables	Terreno	P o V	1000 ml	-- Sin preservativo	24 horas
Sólidos Disueltos	Laboratorio	P o V	1000 ml	Sin preservativo	24 horas
Sólidos Suspendidos	Laboratorio	P o V	1000 ml	Sin preservativo	24 horas
Sólidos Totales	Laboratorio	P o V	1000ml	Sin preservativo	24 horas
Olor	Laboratorio	V	1000 ml	Enfriar 4°C	24 horas
<b>Compuestos Inorgánicos y Metales</b>					
Cianuros	Laboratorio	P o V	1000 ml	Agregar NaOH a pH > 12, enfriar a 4°C en oscuridad. Agregar HNO <sub>3</sub>	24 horas
Nitrógeno Amoniacal	Laboratorio	P o V	500-1000 ml	Acidificar pH < 2 con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , enfriar a 4°C	24 horas
Detergentes	Laboratorio	P o V	500-1000 ml	Sin preservativo	24 horas
Cromo (Cr)	Laboratorio	P o VB	500-1000 ml	Acidificar pH < 2 con HNO <sub>3</sub>	1 mes
Cadmio (Cd)	Laboratorio	P o VB	500-1000 ml	Acidificar pH < 2 con HNO <sub>3</sub>	1 mes
Estaño (Sn)	Laboratorio	P o VB	500-1000 ml	Acidificar pH < 2 con HNO <sub>3</sub>	1 mes
Plomo (Pb)	Laboratorio	P o VB	500-1000 ml	Acidificar pH < 2 con HNO <sub>3</sub>	1 mes
Zinc (Zn)	Laboratorio	P o VB	500-1000 ml	Acidificar pH < 2 con HNO <sub>3</sub>	1 mes
Hierro (Fe)	Laboratorio	P o VB	500-1000 ml	Acidificar pH < 2 con HNO <sub>3</sub>	1 mes
Mercurio (Hg)	Laboratorio	VB	500-1000 ml	Acidificar pH < 2 con HNO <sub>3</sub> , enfriar	1 mes

				a 4°C	
Condiciones de Toma de Muestras por Parámetro	Lugar de Análisis	Envase	Volumen Recomendado de Muestra	Preservación	Tiempo
<b>Parámetros Biológicos y Bioquímicos</b>					
Enterococos	Laboratorio	P o V	> 100 ml	Enfriar a 4°C	24 horas
Coliformes Totales	Laboratorio	P o V	> 100 ml	Enfriar a 4°C	24 horas
Coliformes Fecales	Laboratorio	P o V	> 100 ml	Enfriar a 4°C	24 horas
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5)	Laboratorio	P o V	> 1000 ml	Enfriar a 4°C, oscuridad	24 horas
<b>Compuestos Orgánicos</b>					
Aceites y Grasas	Laboratorio	V	1000 ml	pH < 2 con HCl, enfriar a 4°C	24 horas
Hidrocarburos Totales de Petróleo	Laboratorio	V	1000 ml	pH < 2 con HCl, enfriar a 4°C	24 horas
Plaguicidas Organoclorados	Laboratorio	V	1000 ml	Sin preservativo	24 horas
Plaguicidas Órganofosforados	Laboratorio	V	1000 ml	Sin preservativo	24 horas

P: Envase plástico de Polietileno de alta densidad; V: Envase de vidrio; VB: Envase de vidrio borosilicato

**Tabla 4**  
**Valores Máximos Establecidos**

Para Determinadas Situaciones de Emergencia. Parámetro	Unidades	Valores
<b>Características Físicas y Químicas</b>		
PH		<6.0 o >9.0
Oxígeno Disuelto	mg/l	<3.0
Turbiedad	NTU	>100.0
Transparencia	m	>10%
Color	Pt-Co	>75.0
Sólidos Sedimentables	mg/l	>100.0
Sólidos Disueltos	mg/l	>36,000
Sólidos Suspendidos	mg/l	>125.0
Sólidos Totales	mg/l	>37,000
Olor	TON	>10.0
<b>Compuestos Inorgánicos y Metales</b>		

Cianuros	mg/l	>0.20
Nitrógeno Amoniacal	mg/l	>2.00
Detergentes	mg/l	>1.00
Estaño	mg/l	>0.50
Cromo (Cr)	mg/l	>0.50
Cadmio (Cd)	mg/l	>0.01
Plomo (Pb)	mg/l	>0.50
Zinc (Zn)	mg/l	>15.00
Hierro (Fe)	mg/l	>5.00
Mercurio (Hg)	mg/l	>0.10
<b>Parámetros Biológicos y Bioquímicos</b>		
Enterococos	NMP / 100ml	>500
Coliformes Totales	NMP / 100ml	>5000
Coliformes Fecales	NMP / 100ml	>500
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5)	mg/l	>2.5
<b>Compuestos Orgánicos</b>		
Aceites y Grasas	mg/l	>8.00
Hidrocarburos Totales de Petróleo	mg/l	>5.00
Pesticidas Organoclorados	mg/l	>0.50
Pesticidas Órgano fosforados	mg/l	>0.50

b) Aquellas zonas o áreas donde ocurran derrames de petróleo y sus derivados, vertidos de desechos tóxicos orgánicos e inorgánicos que pongan en riesgo la salud pública.

c) Cuando los valores para los parámetros establecidos superan los requisitos de calidad establecidos en la Tabla 1 del presente decreto ejecutivo, como consecuencia de catástrofes naturales u otras situaciones relacionadas a escala mundial o regional.

d) Áreas de riesgo potencial y/o puntos críticos de contaminación identificadas en los programas de seguimiento, vigilancia y control.

**Artículo 19.** La AMP en conjunto con las demás entidades competentes coordinará la implementación de acciones a escala sectorial para recabar e intercambiar información obtenida campo y/o de gabinete de aquellas áreas declaradas en emergencia y en áreas con riesgo potencial, con la finalidad de determinar la naturaleza y magnitud de la emergencia o riesgo potencial.

## **CAPÍTULO VIII**

### **IMPLEMENTACIÓN**

**Artículo 24:** La Autoridad Competente (AMP) dispondrá de un tiempo de un (1) año, a partir de la entrada en vigencia de esta Norma, para la preparación y capacitación de su personal para su implementación. Durante este tiempo deberán equipar un laboratorio propio o contratar un laboratorio autorizado o acreditado ya sea público o privado para realizar los muestreos según los métodos indicados. Deberán elaborar el Programa de Monitoreo Anual para un período de dos años e iniciar las campañas de monitoreo con la finalidad de caracterizar las aguas marinas y costeras objeto de este Decreto Ejecutivo, una vez concluido el año de preparación. Posterior a la caracterización de las aguas marinas y costeras en el ámbito nacional, se desarrollará y ejecutará el programa de seguimiento, vigilancia y control.

A- Lineamientos para la Selección de los Cuerpos de Agua: Para la selección de los cuerpos de aguas que serán sujeto al monitoreo se deberá contemplar como mínimo los siguientes criterios:

- Áreas costeras donde se desarrollen actividades turísticas, de recreación con contacto directo e indirecto con la población,
- Áreas cercanas a estuarios de los principales ríos del país cuyas descargas afecten directa e indirectamente las comunidades costeras,
- Áreas costeras que reciben aguas residuales procedentes de sistemas de tratamiento de aguas y de otras actividades.
- Incorporar otras zonas que se considere prioritaria para su caracterización, atendiendo los objetivos de esta norma,
- Considerar los cuerpos de agua seleccionados en estudios previos con la finalidad complementar el diagnóstico sobre el estado del recurso sobre la base de datos históricos y actuales.

B- Lineamientos para la Selección de los Puntos de Muestreo: Para la selección de los puntos donde se realizarán los muestreos, se deberá contemplar como mínimo los siguientes criterios:

- Considerar sitios entre 50 y 100 m de la costa o de los estuarios de los principales ríos, cuyas aguas pueden afectar zonas costeras destinadas para uso recreativo.
- Cuando el objetivo del monitoreo es el de control y vigilancia, ubicar los puntos donde se localizan proyectos o empresas que hacen uso del recurso para uso recreativo y/o empresas que realizan otras actividades cercanas a los sitios de recreación,
- Considerar sitios donde se hacen vertimientos o descargas y/o donde se presentan afectaciones por fenómenos naturales, las cuales pueden afectar las áreas de recreación.
- Considerar zonas de playas que en la actualidad son utilizadas como balnearios y áreas de recreación.
- Cada sitio debe reflejar las condiciones del área bajo estudio donde no se anticipan variaciones significativas en los parámetros a analizar.

- Los sitios deben tener suficiente distribución horizontal y vertical para caracterizar el cuerpo de agua bajo estudio.
- La autoridad competente podrá optar por el establecimiento de puntos permanentes de muestreo que permitan el levantamiento continuo de datos. Estos puntos permanentes pueden ser boyas equipadas con equipo de medición de parámetros de calidad del recurso.

#### C- Requisitos para la Toma de Muestras Representativas y Análisis de Laboratorio

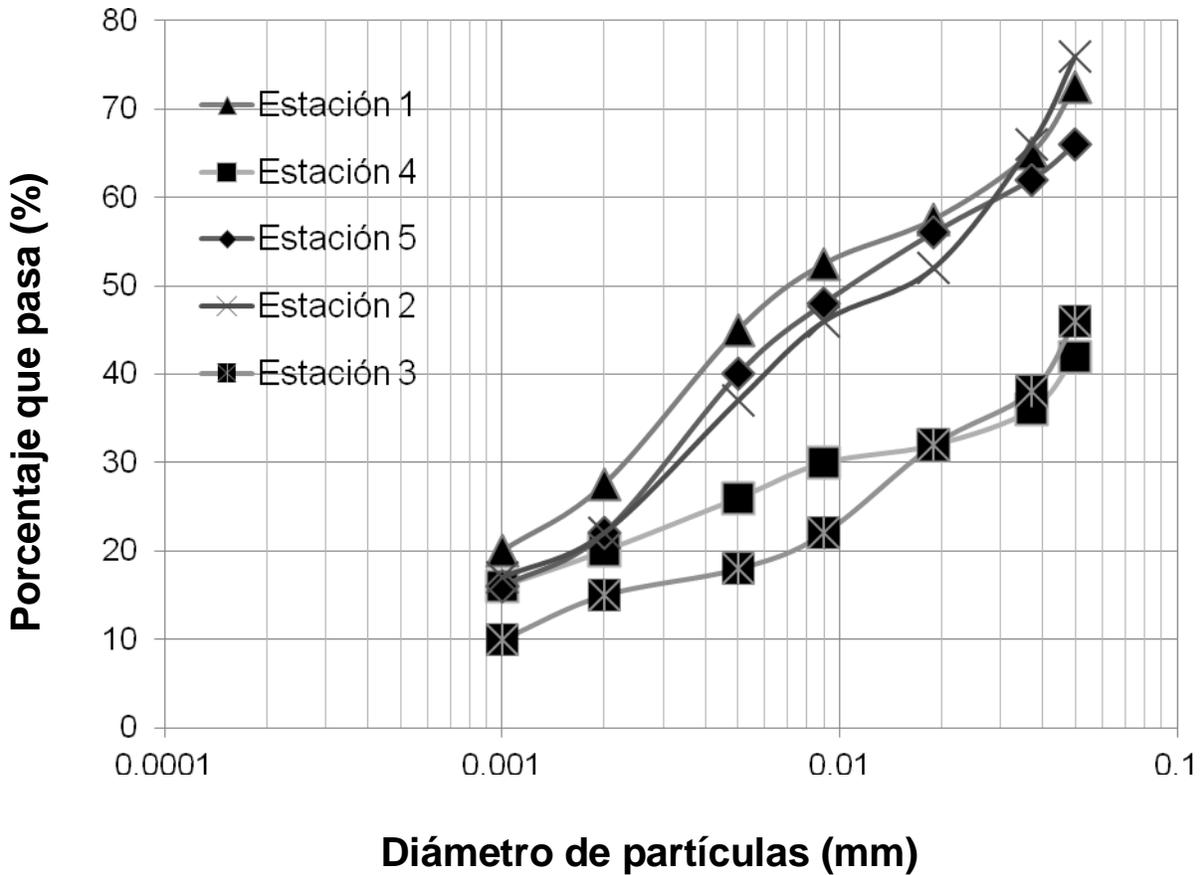
1. La toma de muestras será efectuada por personal idóneo de la autoridad competente o de una entidad privada contratada para realizar los muestreos y análisis.
2. Se realizarán como mínimo cuatro campañas de muestreo en el cuerpo de agua sujeto al análisis, dos en la estación seca y dos en la estación lluviosa. Siendo éstas distribuidas de acuerdo al criterio técnico de la Autoridad competente y considerando los factores ambientales existentes.
3. En cada campaña de muestreo se establecerá un transecto perpendicular a la costa de 3 puntos en cada sitio de muestreo y se coleccionarán las muestras de acuerdo a lo establecido en el punto 7 del presente artículo. La distancia entre los puntos de cada transecto deberá ser no menor de 100 metros. Durante la planificación del programa de monitoreo anual la autoridad competente debe considerar el establecimiento del número de replicas a tomar por campaña de muestreo.
4. Para medir los parámetros en campo, se tomarán muestras simples a distintas profundidades de la columna de agua de la siguiente manera: en los sitios con profundidad de 0-5 metros, se tomará la muestra de agua a 20 cm de la superficie. En los sitios con profundidad de 5-10 metros, se tomará la muestra de agua a 20 cm de la superficie y a 1 metro del fondo. En los sitios con profundidad de 10-20 metros, se tomará la muestra de agua a 20 cm de la superficie, a 10 metros y a 1 metro del fondo; estableciéndose la misma frecuencia de muestreo para cada 10 metros adicionales (ver Tabla 2). Dicho

muestreo se realizará utilizando una botella tipo niskin u otra con las mismas características, únicamente cuando sea lo más adecuado.

**Tabla 2**

<b>Toma de muestras según la profundidad en la columna de Agua. Profundidad columna de agua</b>	<b>Toma de muestra</b>
0-5 metros	20 cm de la superficie
5-10 metros	20 cm de la superficie 1 m del fondo
10-20 metros	20 cm de la superficie 10 m de profundidad 1 m del fondo
20-30 metros	20 cm de la superficie 10 m de profundidad 20 m de profundidad 1 m del fondo

### Anexo 3 (A3.1).



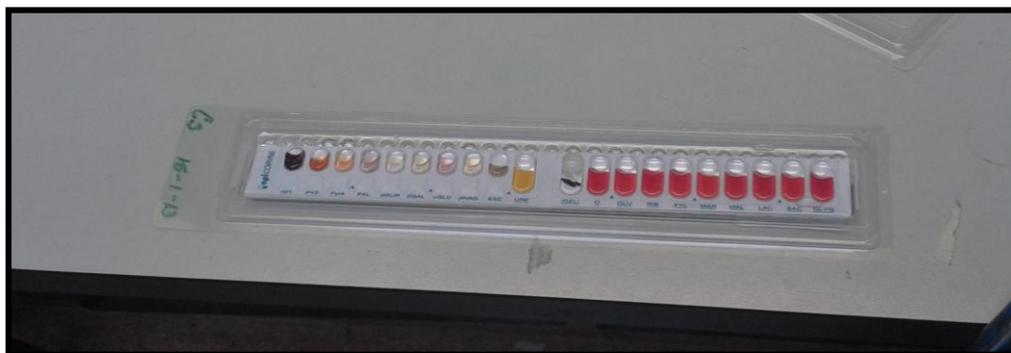
**A2.2. Grafica de granulometría de la estaciones en la zona de estudio**

Para ampliar el conocimiento sobre la composición textural de los sedimentos en la zona de estudio se realizó una distribución de las diferentes fracciones granulométricas, donde se observa que la fracción Limo arcillosa es predominante en todas las estaciones, con niveles superiores al 80%, a excepción de la estación 3, que se encuentra influenciada por las escorrentía del Río Folks River.

## Anexo 4 (A4.1).

El procedimiento de identificación se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales utilizando el sistema comercial API Coryne System (bioMérieux). API Coryne, es un sistema manual capaz de identificar en 24 horas a 49 especies de bacterias corineformes. Contiene 20 pruebas, 11 enzimáticas y 8 de utilización de hidratos de carbono, con su correspondiente control (Figura 4.7).

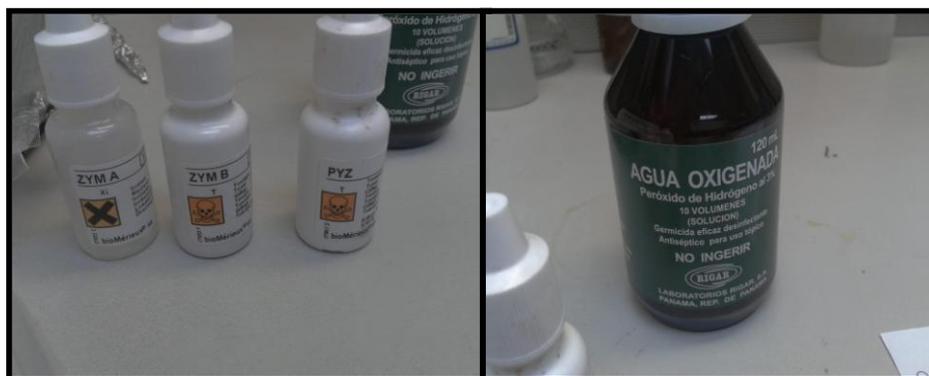
Los primeros 11 pocillos (reducción del nitrato, pirazinamidasas, pirrolidoniil arilamidasa, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -glucuronidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\alpha$ -glucosidasa, N-acetil  $\beta$ -glucosaminidasa, hidrólisis de la esculina, ureasa, hidrólisis de gelatina) fueron inoculados con una suspensión bacteriana equivalente al tubo N° 6 de la escala de Mc Farland. Se llenó el tubo y la cúpula con la suspensión. El pocillo correspondiente a la prueba de ureasa se llenó con aceite de parafina estéril. Los últimos 9 pocillos (control de fermentación de hidratos de carbono, fermentación de: glucosa, ribosa, xilosa, manitol, maltosa, lactosa, sacarosa, y glucógeno), con la mezcla resultante de la adición de 0,5 ml de la suspensión del microorganismo equivalente al tubo N° 6 de la escala de Mc Farland en un medio enriquecido que contenía un indicador de pH (GP medium). Las cúpulas se llenaron con aceite de parafina estéril.



### Regla de determinación del biocódigo

La reacción de catalasa (prueba 21 de la galería) se realizó añadiendo una gota de agua oxigenada al 3% en la prueba de esculina o gelatina. La aparición de

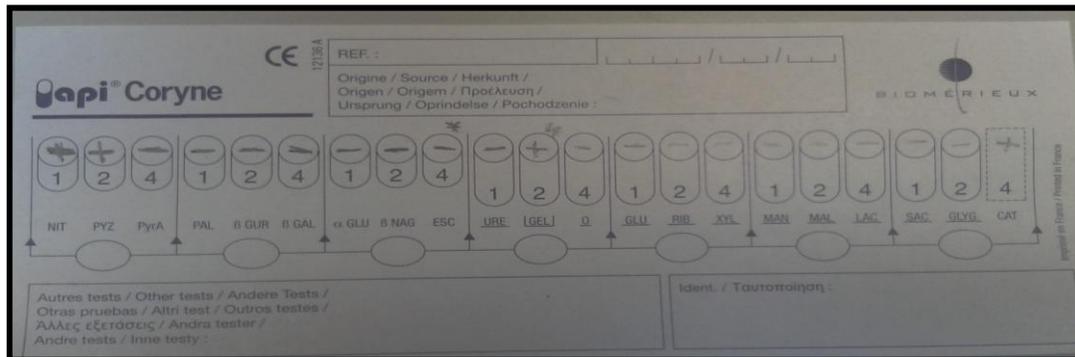
burbujas se interpretó como prueba positiva. El pocillo de nitratos fue revelado por adición de los reactivos 1 (ácido sulfanílico-ácido acético) y 2 (N,Ndimetil-1-naftilamina). Los pocillos con enzimas (pirazinamidasas, pirrolidonil arilamidasa, fosfatasa alcalina,  $\beta$ - glucuronidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\alpha$ -glucosidasa, N-acetil  $\beta$ -glucosaminidasa) fueron revelados con 1 gota del reactivo ZYM A (Tris-hidroximetil-aminometano y lauril sulfato de sodio) y una gota de ZYM B (Fast Blue BB) y leídas luego de 10 minutos.



#### Reactivos Utilizados

La lectura de las reacciones se llevó a cabo utilizando la guía del fabricante y se codificó el conjunto de los resultados obtenidos en un perfil numérico (biocódigo) el cual fue leído en un programa computarizado (versión 2.0).

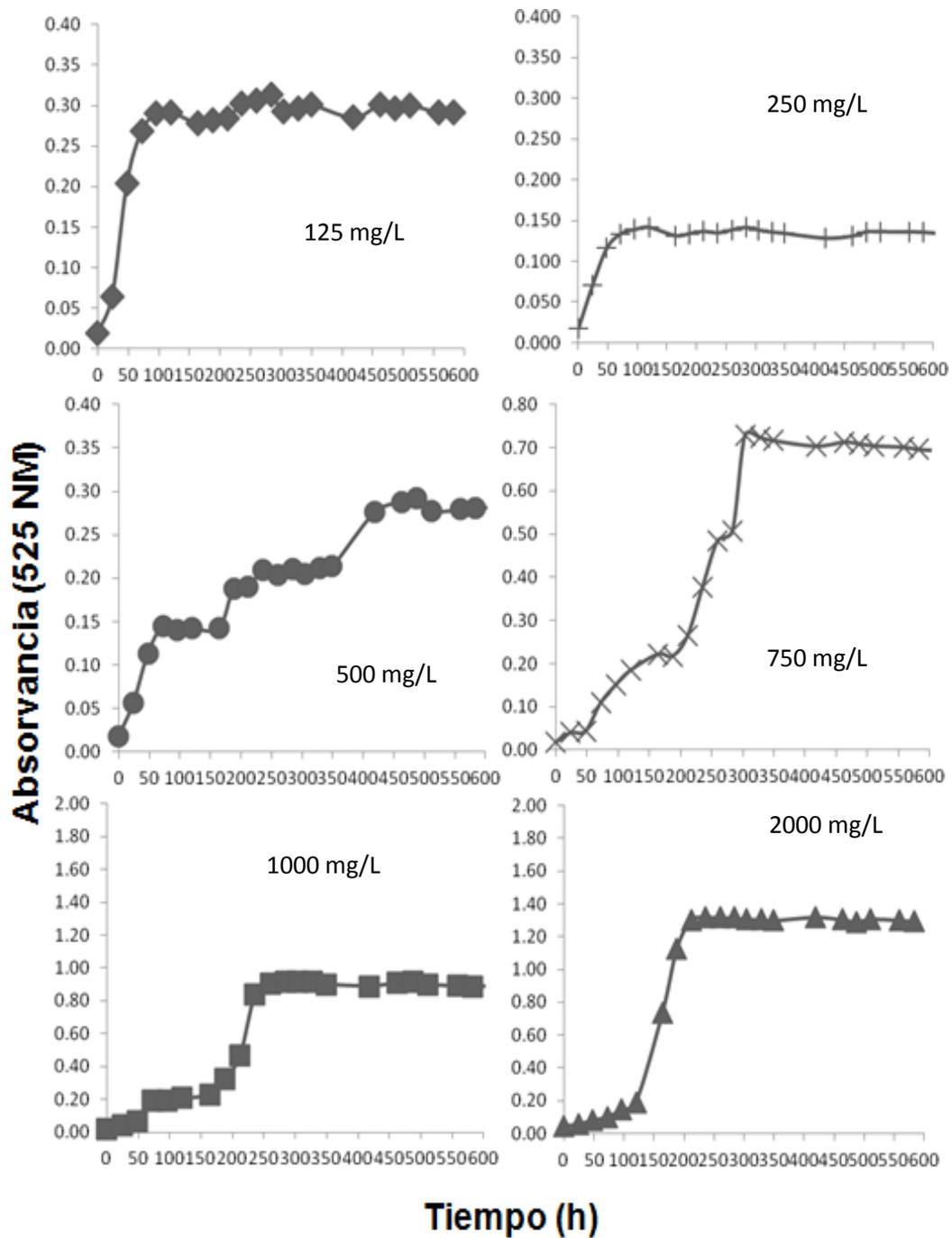
Se consideró “identificación correcta” cuando el sistema indicó que el biocódigo obtenido correspondía a una identificación excelente, muy buena o buena, y coincidió con la identificación por el método patrón. La expresión “baja discriminación” fue aceptada como correcta, cuando el microorganismo pudo ser identificado mediante el uso de pruebas adicionales sugeridas por el fabricante.



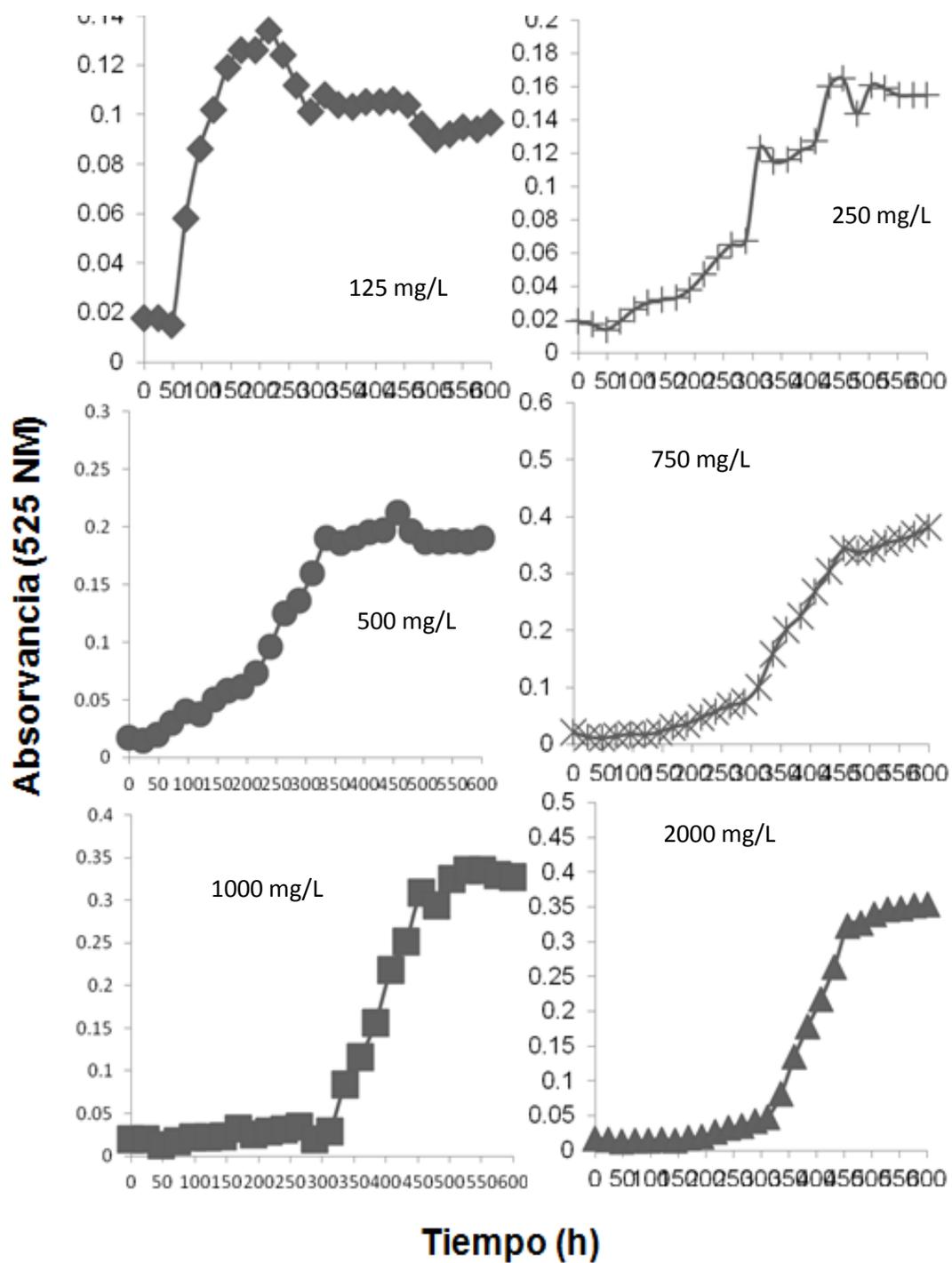
### Perfil numérico (biocódigos)

Se consideró “identificación incorrecta” cuando el biocódigo correspondió a una especie diferente de la identificada por el método patrón. Las pruebas bioquímicas practicadas a cada una de las cepas aisladas que conformaron el cultivo mixto permitieron la identificación de los generos *Corynebacterium propinquum* y *Rhodococcus equi*.

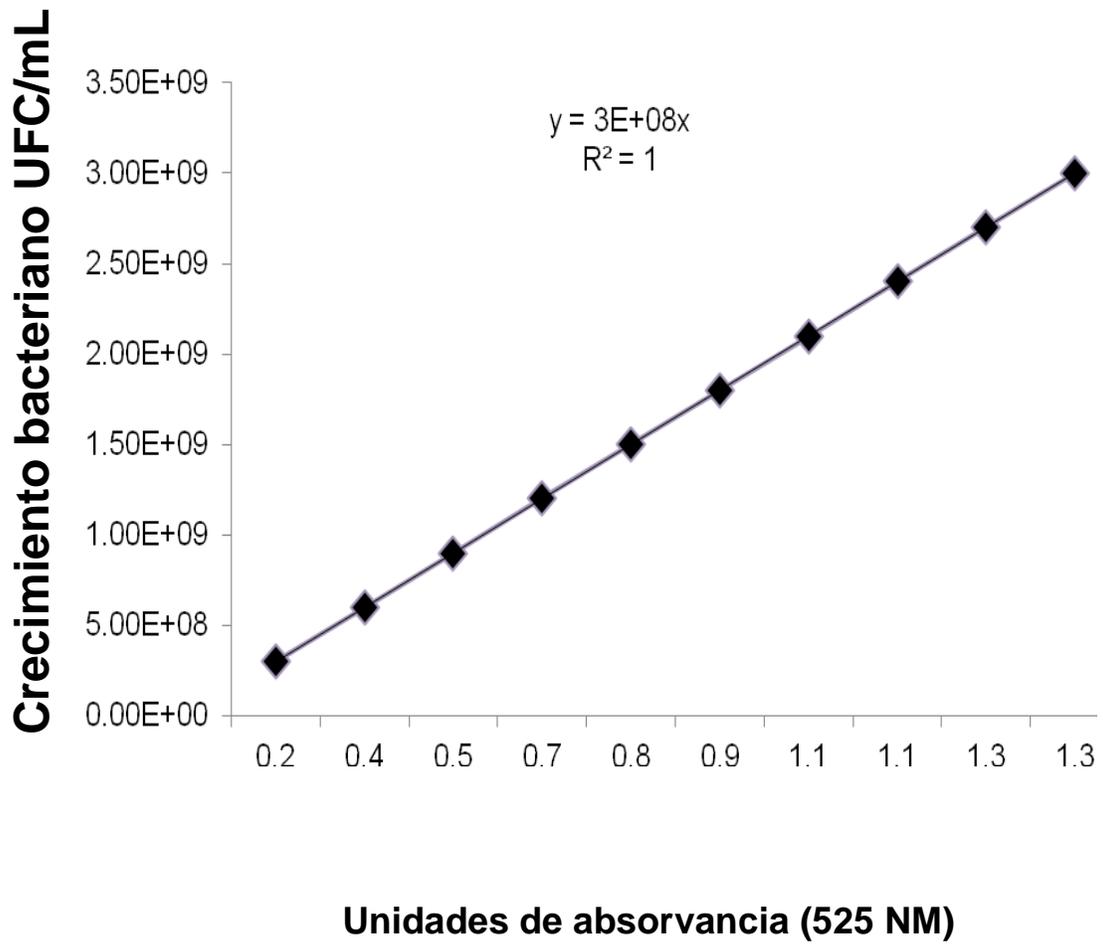
## Anexo 4 (A4.2).



A4.1. Curva de Crecimiento de la *Rhodococcus equi* sobre el naftaleno. (Septiembre 2012).



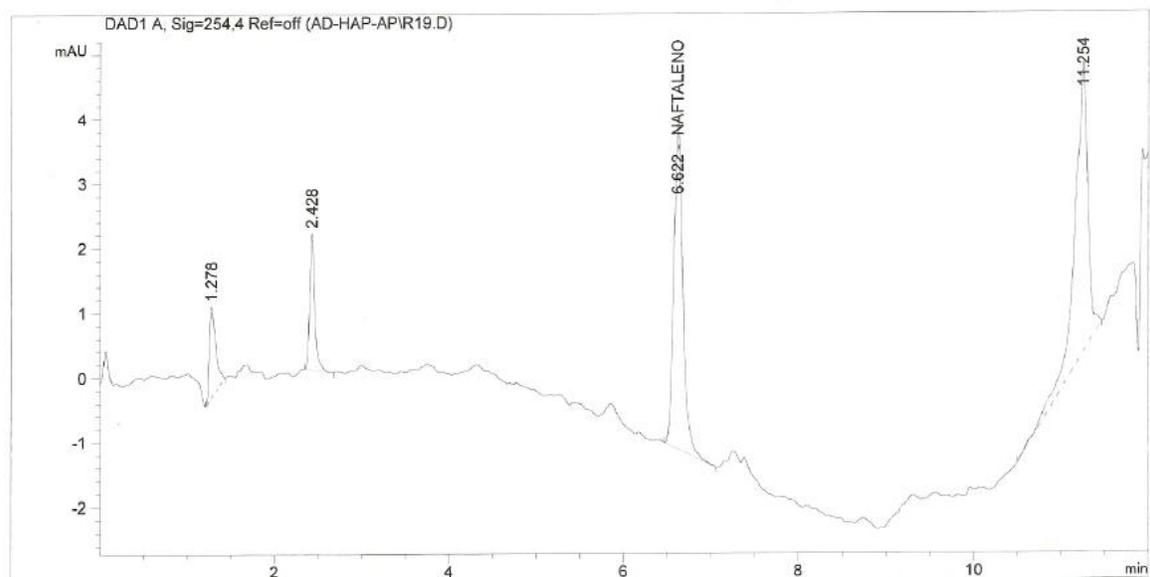
A4.2. Curva de Crecimiento de la *Rhodococcus equi* sobre el naftaleno. (Julio 2013).



A4.3. Curva de Calibración del Crecimiento bacteriano en función de UFC/mL/absor.

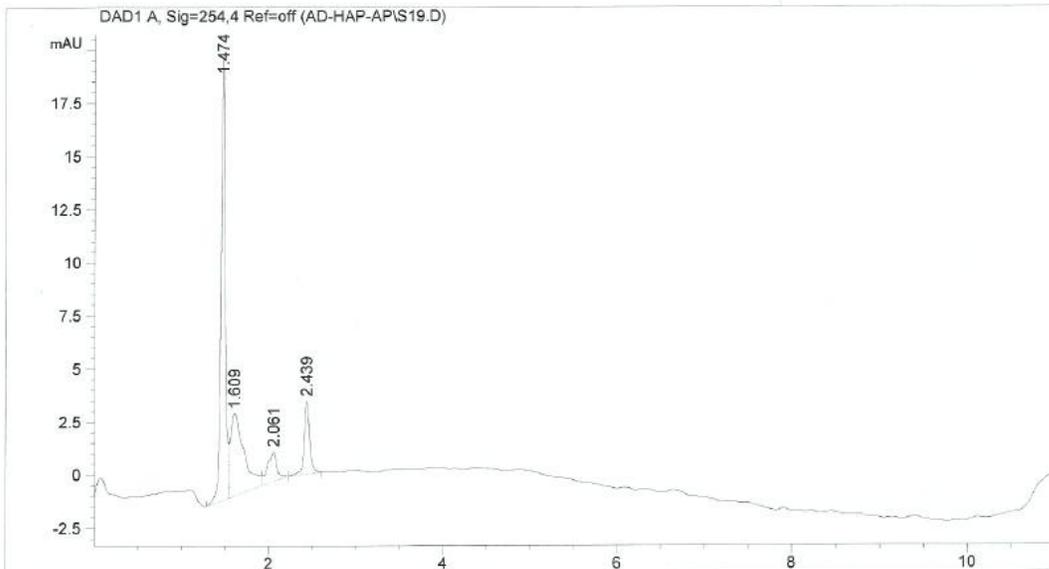
## Anexo 5 (A5.1)

Como se describió en la metodología antes de inyectar las muestras a analizar se inyectaron patrones de Naftaleno y n-Hexano, Naftaleno y el medioartificial para que el equipo pudiese hacer la curva de calibración.



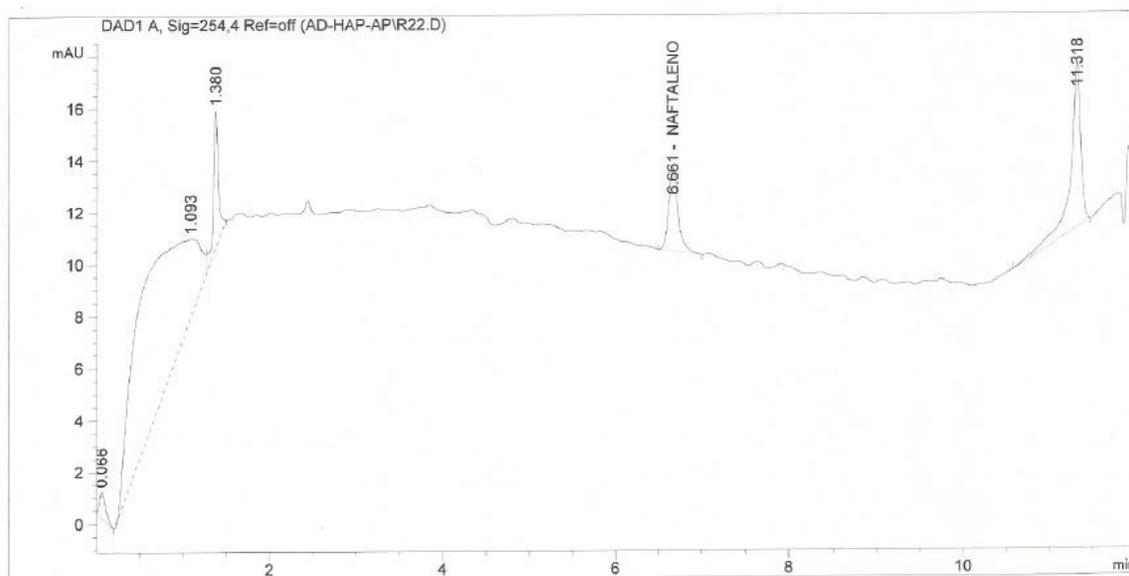
**Cromatógrama de la muestra del reactor al inicio del ensayo 2 a las 48 horas.**

En esta Figura, se observa la presencia de Naftaleno a los 6.622 minutos en una muestra tomada del reactor. Esto prueba que la concentración del Naftaleno se redujo de 30 mg/L a 8,43 mg/L, obteniendo una eficiencia de 71,9%, debido a la degradación efectuada por las bacterias *Rhodococcus equi*, pasada las 48 horas para finalizar el segundo ensayo se tomo otra muestra en la salida a las 96 horas



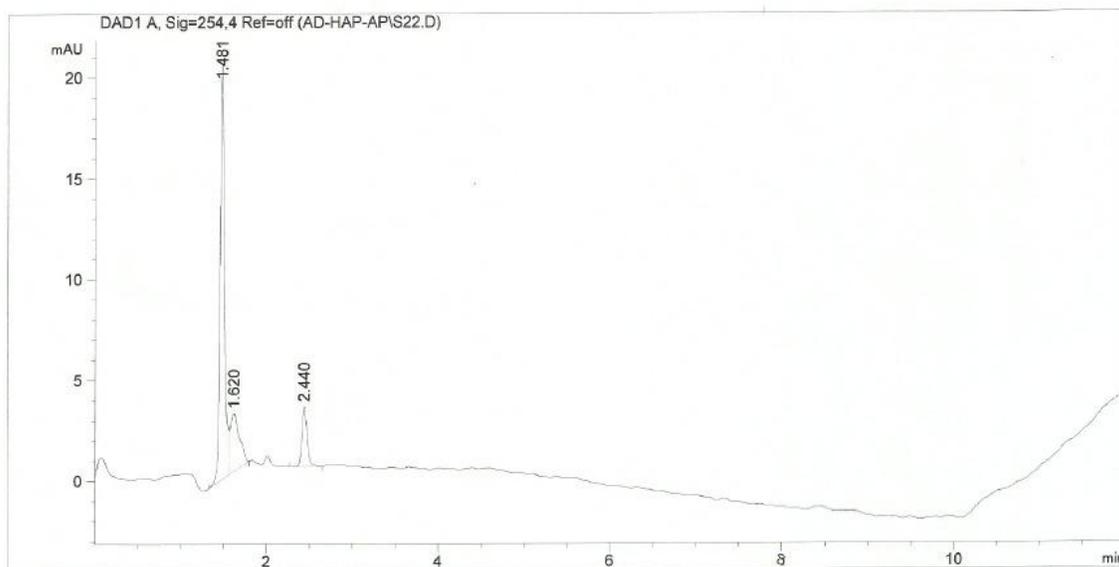
**Cromatograma de la muestra tomada de la salida al final del ensayo 2 a las 96 horas.**

Sin embargo, en la Figura anterior no se observa la presencia de Naftaleno. Esta muestra se tomó del tanque de salida, pudiendo observar que el afluente tratado salía del sistema sin naftaleno. Por lo que se puede concluir que a las 96 horas la eficiencia de degradación de naftaleno por la cepa *Rhodococcus equi* es del 100%.



**Cromatograma muestra del reactor tomada al inicio del Ensayo 5 a las 192 horas.**

La presencia de Naftaleno en esta muestra del reactor se dio a los 6,661 minutos con una concentración 6,86 mg/L. Ocurrió el mismo fenómeno de degradación que en la muestra del reactor del Ensayo 2 por la presencia de las bacterias *Rhodococcus equi*, viendo así una eficiencia casi del 6% mayor a la anterior.

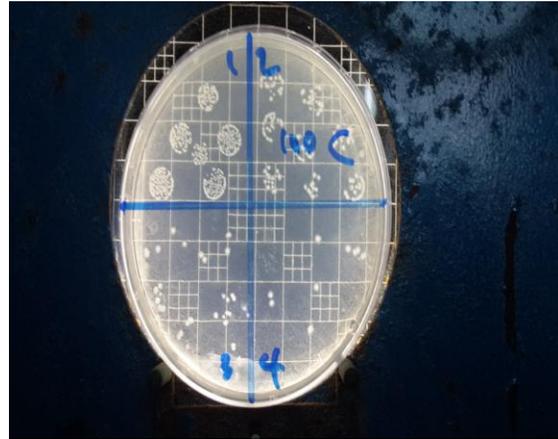


**Cromatógrama muestra de salida del ensayo 5 a las 240 horas.**

Mientras que en esta muestra de la salida no se presencié ninguna concentración de Naftaleno a los 6,6 minutos; por lo que se puede concluir que a las 240 h la eficiencia de degradación de naftaleno por la cepa *Rhodococcus equi* es del 100%.

La importancia de la temperatura en la velocidad de las reacciones bioquímicas; en este caso este parámetro fue muy difícil de controlar y se mantuvo entre los 23°C y los 26°C. Al igual que la temperatura el pH, fue otro parámetro del cual no se tuvo control, por ello se hicieron mediciones cada 24 horas para el Escenario 1 y 48 horas para el Escenario 2, para así tener en cuenta los cambios bruscos e interpretar si hubiese problemas en el proceso de biodegradación.

## ANEXO A5.2.



Imágenes de las actividades y equipos del la investigación



**Imágenes de las actividades y equipos del la investigación**