



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS AISLADAS A
PARTIR DE SUELOS, CON POTENCIAL PARA DEGRADAR
PCB's PRESENTES EN ACEITES DIELECTRICOS
PROVENIENTES DE LA CENTRAL HIDROELÉCTRICA "ALAO"
DE LA EMPRESA ELÉCTRICA RIOBAMBA S.A**

Trabajo de titulación para optar por el título de:

INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORAS: Diana Victoria Arellano Yasaca

Carmen Rocio Yambay Damián

TUTORA: DRA. NANCY VELOZ MAYORGA

RIOBAMBA - ECUADOR

2016

©2016, Diana Victoria Arellano Yasaca y Carmen Rocio Yambay Damián

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El tribunal certifica que: El trabajo de titulación “CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS AISLADAS A PARTIR DE SUELOS, CON POTENCIAL PARA DEGRADAR PCB’s PRESENTES EN ACEITES DIELECTRICOS PROVENIENTES DE LA CENTRAL HIDROELÉCTRICA “ALAO” DE LA EMPRESA ELÉCTRICA RIOBAMBA S.A” de responsabilidad de las señoritas: Diana Victoria Arellano Yasaca y Carmen Rocio Yambay Damián, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

DRA. NANCY VELOZ MAYORGA
DIRECTORA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN

DR. GERARDO MEDINA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Nosotras, Diana Victoria Arellano Yasaca y Carmen Rocío Yambay Damián, declaramos que el presente trabajo de titulación es de nuestra autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autoras, asumimos la responsabilidad legal y académicas de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 14 de abril del 2016

Diana Victoria Arellano Yasaca
0603812975

Carmen Rocío Damián Yambay
0604107680

Nosotras, Diana Victoria Arellano Yasaca y Carmen Rocío Yambay Damián, somos responsables de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Proyecto de Titulación y el patrimonio intelectual del Proyecto de titulación, pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

DIANA VICTORIA ARELLANO YASACA

CARMEN ROCIO YAMBAY DAMIÁN

DEDICATORIA

Detrás de este logro se encuentra el apoyo incondicional de seres especiales y llenos de amor que hicieron este camino más fácil y emocionante. Por ello, dedico esta investigación a Dios, por ser mi sustento absoluto, mi roca y mi baluarte; a mis padres por todo el amor que han demostrado en cada acción que realizaron para verme alcanzar esta meta. A mis hermanas y hermano por darme la oportunidad de crecer junto a ellos y guiarme con su ejemplo. A todos mis amigos por estar conmigo oportunamente en los peores y mejores momentos de mi vida; a cada uno los considero importantes y sin duda alguna todos ocupan un lugar muy especial en mi corazón.

Diana

A Dios y a la Virgen de Fátima, por las bendiciones derramadas en mi vida, y por haber puesto en mi camino experiencias y personas que contribuyen a mi crecimiento personal y profesional.

A mis padres: Lourdes y Pablo, gracias por sus consejos, apoyo y amor incondicional en mi vida, con gusto y amor cumplo la promesa de hace 20 años.

A mi familia, en especial a mi tío Alfredo y abuelita Juanita, un Dios le pague por ser mis segundos padres, mi vida no sería la mitad de afortunada de lo que es, si ustedes no estuvieran en ella.

A Sofía y Paola, por ser dos ángeles que me enseñaron que no eres lo que logras sino lo que superas.

A Dianita Victoria, más que una amiga, una hermana gracias por tu incondicional confianza y amistad en esta aventura.

Carmen

AGRADECIMIENTO

A Dios, por la vida y las enseñanzas durante nuestra etapa universitaria.

A nuestros padres y familias, por el apoyo total en cada decisión.

A la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y en ella cada uno de los docentes que hicieron posible esta investigación.

Al Dr. Gerardo Medina, por su profunda ayuda y colaboración, sobre todo por siempre creer en nosotras, nunca olvidaremos sus enseñanzas.

A la Dra. Nancy Veloz por su guía en cada fase investigativa y a su vez un sincero agradecimiento al Lab CESTTA, por su colaboración.

A la Empresa Eléctrica Riobamba S.A, representada por el Ing. Paúl Burbano y a todo el departamento de Gestión Ambiental, gracias por la atención y ayuda prestada en cada requerimiento.

Gracias a todos aquellos amigos y compañeros que siempre nos alentaron en nuestro trabajo y fueron una luz en este camino.

“La gratitud es la memoria del corazón”

Diana y Carmen.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	xv
ÍNDICE DE ANEXOS	xvii
RESUMEN	xix
SUMMARY	xx
CAPÍTULO I	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Identificación del problema	1
1.2. Justificación de la investigación	3
1.3. Objetivos	4
1.3.1. Objetivo General	4
1.3.2. Objetivos Específicos.....	4
CAPÍTULO II	
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Antecedentes de la investigación	5
2.2. Marco conceptual.....	6
2.2.1. Aceite mineral	6
2.2.2. Compuestos Orgánicos Persistentes (COP's)	7
2.2.3. Mecanismos y rutas de degradación de los COP's	8
2.2.4. Bifenil Policlorados (PCB's)	9
2.2.4.1. Características de los PCB's	10
2.2.4.2. PCB's en el ambiente.....	11
2.2.4.3. Vías de exposición	12
2.2.4.4. Efectos de los PCB's sobre la salud.....	12

2.2.5.	Determinación De PCB's	13
2.2.5.1.	Análisis por Cromatografía de gases	13
2.2.5.2.	Pruebas Colorimétricas	14
2.2.6.	Métodos de descontaminación, tratamiento, destrucción y eliminación de PCB's	14
2.2.6.1.	Incineración.....	14
2.2.6.2.	Métodos Químicos	15
2.2.6.3.	Métodos Físicos	16
2.2.6.4.	Métodos con Energía Radiante	16
2.2.6.5.	Métodos Biológicos	16
2.2.7.	Biorremediación.....	17
2.2.7.1.	Ventajas y desventajas de la biorremediación	17
2.2.8.	Bacteria	18
2.2.8.1.	Cepa Bacteriana	18
2.2.8.2.	Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas	18
2.2.8.3.	Crecimiento Microbiano	19
2.2.8.4.	Bacterias como degradadoras de PCB's	20
2.2.8.5.	Ruta de degradación de los PCB's	20
2.2.8.6.	Tiempos de degradación de PCB's	21
2.2.9.	Tratamiento In Vitro	21
2.2.9.1.	Matriz de tratamiento	21
2.2.10.	Caracterización bacteriana	22
2.2.10.1.	Características microscópicas	22
2.2.10.2.	Características macroscópicas.....	23
2.2.10.3.	Identificación de bacterias mediante pruebas bioquímicas.....	23
a.	Prueba del Citrato	24
b.	Prueba de Ureasa.....	26

c.	Prueba de Lisina.....	27
d.	Prueba de Glucosa/ Lactosa	29
e.	Prueba SIM (Sulfuro, Indol, Movilidad).....	31
f.	Prueba Manitol.....	33
2.2.11.	Normativa legal que regula el uso de PCB's	35
2.2.11.1.	Constitución Política de la República del Ecuador	35
2.2.11.2.	Convenios Internacionales	35
2.2.11.3.	Ley de Gestión Ambiental	36
2.2.11.4.	Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria del Ministerio del Ambiente, Libro VI.....	36
2.2.11.5.	Acuerdo Ministerial 146 “Los Procedimientos para la Gestión Integrada y Ambientalmente Racional de los Bifenilos Policlorados (PCB) en el Ecuador”.	37
2.2.11.6.	Manual de Procedimientos para el Manejo de Bifenílos Policlorados (PCB's) en el Sector Eléctrico Ecuatoriano	37
CAPÍTULO III		
3.	METODOLOGÍA	38
3.1.	Metodología de la Investigación	38
3.2.	Lugar del desarrollo de la investigación	39
3.2.1.	Lugar de muestreo.....	39
3.2.2	Lugar de recolección de datos.....	40
3.3.	Fases de la investigación.....	40
3.3.1.	Fase I: Caracterización del aceite dieléctrico.....	40
3.3.1.1.	Procedimiento del muestreo del aceite dieléctrico.....	42
3.3.2.	Fase II: Aislamiento, purificación, caracterización e identificación de cepas bacterianas.....	44
3.3.2.1.	Aislamiento	45
3.3.2.2.	Purificación	55

3.3.2.3.	Caracterización de las cepas puros.....	56
3.3.2.4.	Identificación de la especie de las cepas.....	62
a.	Prueba de oxidasa	62
b.	Prueba de catalasa	63
c.	Prueba del uso de citrato como única fuente de carbono y energía	64
d.	Prueba de Ureasa.....	64
e.	Fermentación de glucosa, lactosa y producción de H ₂ S... ..	65
f.	Prueba de la descarboxilacion/ desaminación de la Lisina	66
g.	Prueba de movilidad, producción de indol y H ₂ S (SIM medio)	67
h.	Prueba de la fermentación del Manitol - Movilidad	68
3.3.3.	Fase III: Evaluación de la degradación de PCB's mediante una prueba in vitro	69
3.3.3.1.	Selección de un medio de cultivo óptimo para la masificación de las cepas.....	69
3.3.3.2.	Selección de cepas para el experimento in vitro	70
3.3.3.3.	Formación de bancos primarios de las cepas	71
3.3.3.4.	Masificación de las cepas.....	72
3.3.3.5.	Densidad celular obtenida tras la masificación de las cepas.....	74
3.3.3.6.	Dosificación	74
3.3.3.7.	Mediciones de PCB's.....	77
3.3.3.8.	Recuento de microorganismos en el experimento	77
3.3.3.9.	Control de condiciones ambientales	79
CAPÍTULO IV		
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	82
4.1.	Fase I: Caracterización del aceite dieléctrico.....	82
4.2.	Fase II: Aislamiento, purificación, caracterización e identificación de cepas bacterianas.....	83
4.2.1.	Aislamiento de colonias bacterianas	83

4.2.1.1.	Recuento en placa de bacterias presentes en el suelo	83
4.2.1.2.	Aislamiento de colonias de diferente morfología	85
4.2.1.3.	Estabilización de colonias.....	91
4.2.1.4.	Pruebas de Resistencia a Aceite contaminado con PCB's.....	93
4.2.2.	Caracterización de las cepas bacterianas	96
4.2.2.1.	Microscópica.....	97
4.2.2.2.	Macroscópica	98
4.2.2.3.	Prueba de resistencia de las colonias a metales pesados.....	99
4.2.2.4.	Capacidad de crecimiento a temperatura ambiente.....	101
4.2.3.	Identificación mediante pruebas bioquímicas.....	102
4.3.	Fase III: Evaluación de degradación de PCB's, mediante una prueba in vitro	104
4.3.1.	Selección de un medio de cultivo líquido óptimo para la masificación de las cepas.....	104
4.3.2.	Criterios de selección de cepas bacterianas	105
4.3.3.	Masificación de las cepas bacterianas (caldo madre)	107
4.3.4.	Evaluación de la reducción de PCB's por acción de las bacterias, en una prueba in vitro	108
4.3.5.	Recuento bacteriano de las unidades experimentales	110
4.3.5.1.	Crecimiento de Pseudomona alcalígenes durante la prueba in vitro	111
4.3.5.2.	Crecimiento de Providencia rettgeri durante la prueba in vitro.....	112
4.3.5.3.	Crecimiento de Providencia stuartii durante la prueba in vitro	113
4.3.6.	Control de las condiciones ambientales	114
	CONCLUSIONES	115
	RECOMENDACIONES.....	116
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Propiedades de diferentes mezclas de Aroclor.....	10
Tabla 2.	Composición del agar hierro de Kligler.....	29
Tabla 3.	Microorganismos identificados por SIM.....	33
Tabla 4.	Metodología de la investigación.....	38
Tabla 5.	Composición de Agar para métodos estándar.....	46
Tabla 6.	Composic...ión del Medio mínimo.....	47
Tabla 7.	Resultados de la concentración de PCB's en muestra de aceite.....	82
Tabla 8.	Recuento en placa de microorganismo del suelo.....	84
Tabla 9.	Primer aislamiento de colonias a las 24 horas de siembra.....	87
Tabla 10.	Segundo aislamiento de colonias bacterianas a las 96 horas de la siembra.....	88
Tabla 11.	Tercer aislamiento de colonias bacterias a las 168 horas de crecimiento.....	90
Tabla 12.	Resultados de los repiques realizados.....	92
Tabla 13.	Colonias resistentes a aceite contaminado con 43, 6 ppm de PCB's.....	93
Tabla 14.	Colonias resistentes a aceite contaminado con PCB's (>500 ppm).....	95
Tabla 15.	Caracterización Microscópica.....	97
Tabla 16.	Caracterización macroscópica de las cepas bacterianas.....	98
Tabla 17.	Evaluación de la tolerancia a metales pesados de las cepas aislados.....	99
Tabla 18.	Crecimiento de las cepas a temperatura ambiente (17 °C) durante 48 horas.....	101

Tabla 19.	Identificación bioquímica de cepas bacterianas.....	103
Tabla 20.	Criterios de selección de las cepas para pruebas in vitro.....	105
Tabla 21.	Concentración celular obtenida de la incubación a 30°C por 24 horas.....	108
Tabla 22.	Resultados de la prueba in vitro para la evaluación de reducción de PCB's.....	109
Tabla 23.	Recuento del número de colonias en las placas durante el experimento.....	111
Tabla 24.	Control de las condiciones ambientales durante el experimento in vitro.....	114

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<i>Ilustración 1.</i>	Estructura de los Bifenil Policlorados.....	10
<i>Ilustración 2.</i>	Bioacumulación de PCB's en organismos.....	12
<i>Ilustración 3.</i>	Ruta de degradación del Bifenilo.....	21
<i>Ilustración 4.</i>	Matriz experimental adecuada.....	22
<i>Ilustración 5.</i>	Resultados de pruebas de Citrato.....	25
<i>Ilustración 6.</i>	Resultados para la prueba de ureasa.....	26
<i>Ilustración 7.</i>	Resultados de la prueba de lisina.....	28
<i>Ilustración 8.</i>	Resultados de prueba Klingler.....	30
<i>Ilustración 9.</i>	Resultado de producción de H ₂ S.....	32
<i>Ilustración 10.</i>	Resultado de pruebas de indol.....	32
<i>Ilustración 11.</i>	Resultado de Movilidad de la prueba de SIM.....	33
<i>Ilustración 12.</i>	Resultado de la prueba de manitol.....	34
<i>Ilustración 13.</i>	Mapa de Ubicación de la Central Hidroeléctrica "Alao".....	39
<i>Ilustración 14.</i>	Diagrama de Flujo de la Investigación.....	41
<i>Ilustración 15.</i>	Toma de aceite dieléctrico.....	43
<i>Ilustración 16.</i>	Prueba colorimétrica del aceite dieléctrico antes y después de su esterilización.....	48
<i>Ilustración 17.</i>	Purificación por estriado de las colonias aisladas.....	56
<i>Ilustración 18.</i>	Experimentos a realizarse.....	75
<i>Ilustración 19.</i>	Resultado del ensayo realizado con el kit colorimétrico.....	83
<i>Ilustración 20.</i>	Crecimiento bacteriano a 30°C en 24 horas en los distintos medios.....	84

<i>Ilustración 21.</i>	Crecimiento de las cepas en Mm con 25 μ L de aceite (43,6 ppm de PCB's).....	94
<i>Ilustración 22.</i>	Crecimiento de las cepas en presencia de 250 μ L de aceite contaminado con 500 ppm de PCB's, en medio STD.....	95
<i>Ilustración 23.</i>	Porcentajes de las cepas tolerantes a metales pesados.....	100
<i>Ilustración 24.</i>	Bacterias seleccionadas.....	106
<i>Ilustración 25.</i>	Reducción de la concentración de PCB's a los 42 días por las cepas seleccionados.....	109
<i>Ilustración 26.</i>	Crecimiento de la cepa A durante el tiempo de experimento.....	111
<i>Ilustración 27.</i>	Crecimiento de la cepa B durante el tiempo de experimento.....	112
<i>Ilustración 28.</i>	Crecimiento de la cepa B durante el tiempo de experimento.....	113

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A.	Tabla de propiedades físico químicas de los aceites dieléctricos.
ANEXO B.	Características Físico Químicas de los PCB's
ANEXO C.	Tabla para la estimación de UFC/mL según la escala de McFarland.
ANEXO D.	Resultados del análisis de PCB's del aceite dieléctrico utilizado para el experimento <i>in vitro</i> .
ANEXO E.	Cálculo del número de colonias según la INEN.
ANEXO F.	Guía para determinar la morfología de las colonias bacterianas.
ANEXO G.	Temperatura promedio de la ciudad de Riobamba durante los meses de investigación en laboratorio.
ANEXO H.	Tabla de resultados de las pruebas bioquímicas para identificación de especies del género <i>Pseudomonas</i> .
ANEXO I.	Tabla de resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de especies de la familia <i>Enterobacteriaceal</i> .
ANEXO J.	Resultados del análisis de PCB's en el grupo control (arena más aceite) en el tiempo 0, utilizado para el experimento <i>in vitro</i> .
ANEXO K.	Resultados del análisis de PCB's en la Unidad Experimental A en el tiempo 0 del experimento <i>in vitro</i> .
ANEXO L.	Resultados del análisis de PCB's en la Unidad Experimental B en el tiempo 0 del experimento <i>in vitro</i> .
ANEXO M.	Resultados del análisis de PCB's en la Unidad Experimental C en el tiempo 0 del experimento <i>in vitro</i> .
ANEXO N.	Resultados del análisis de PCB's en el grupo control (arena más aceite) a los 42 días, utilizado para el experimento <i>in vitro</i> .

- ANEXO O. Resultados del análisis de PCB's en la Unidad Experimental A a los 42 días del experimento *in vitro*.
- ANEXO P. Resultados del análisis de PCB's en la Unidad Experimental B a los 42 días del experimento *in vitro*.
- ANEXO Q. Resultados del análisis de PCB's en la Unidad Experimental C a los 42 días del experimento *in vitro*.

RESUMEN

El propósito de esta investigación fue caracterizar cepas bacterianas con potencial para degradar PCB's presentes en aceites dieléctricos. Para lo cual se aislaron bacterias a partir de muestras del suelo de la Central Hidroeléctrica Alao, usando tres medios de cultivo distintos: Agar Métodos Estándar, PAS y Mm, cada uno suplementado con 25 µL de aceite contaminado con 43,6 ppm de PCB's. Se aislaron 19 colonias bacterianas que posteriormente fueron sometidas a una mayor concentración de PCB's; 18 colonias lograron resistir 250 µL de aceite contaminado con 500 ppm de PCB's. Una vez purificadas, estas fueron caracterizadas de acuerdo a sus rasgos microscópicos y macroscópicos y a la tolerancia a metales pesados. Mediante pruebas bioquímicas se identificaron 18 cepas pertenecientes a las especies *Providencia alcalifaciens*, *Proteus mirabilis*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Pseudomona alcaligenes*, *Morganella morganii* y *Shigella dysenteriae*. Se seleccionaron 3 cepas para evaluar su capacidad de degradar PCB's: *Pseudomona alcaligenes*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*. Cada cepa fue dosificada en una matriz experimental compuesta estratégicamente por aceite contaminado con PCB's sobre arena para aumentar la superficie de contacto entre las bacterias y el contaminante. *Pseudomona alcaligenes* logró reducir el 33% de PCB's, seguida por *Providencia rettgeri* con 26 % y finalmente *Providencia stuartii* con 12%, todas en un periodo de 42 días. Se concluyó así, que fue posible encontrar en nuestro medio bacterias capaces de biodegradar PCB's, abriendo paso a estudios que busquen aplicar este método a escalas mayores. Se recomienda realizar investigaciones que aspiren potenciar la degradación de PCB's mediante el uso de cualquiera de las bacterias encontradas.

PALABRAS CLAVE: <BIFENIL POLICLORADOS (PCB'S)> <ACEITE DIELÉCTRICO> <BACTERIA [*Pseudomona alcaligenes*] > < BACTERIA [*Providencia rettgeri*] > < BACTERIA [*Providencia stuartii*] > < BIODEGRADAR>

SUMMARY

The purpose of this research was to characterize bacteria strains with the potential to degrade PCB's present in dielectric oils. To this end bacteria was isolated from soil sample from the "Alao" Hydroelectric Center, using three different cultivation methods: Standard Methods Agar, PAS and Mm, each one supplemented with 25 µL of oil contaminated with 43,6 ppm of PCB's. Nineteen bacterial colonies were isolated and subsequently subjected to a higher concentration of PCB's. Eighteen colonies were able to withstand 250 µL of oil contaminated with 500 ppm of PCB's. Once purified these were characterized according to their microscopic and macroscopic traits and tolerance to heavy metals. Through biochemical testing, 18 strains were identified belonging to the species *Providencia alcalifaciens*, *Proteus mirabilis*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Pseudomona alcaligenes*, *Morganella morganii* y *Shigella disenteriae*. Three strains were selected to evaluate their ability to degrade PCB's: *Pseudomona alcaligenes*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*. Each strain was dosed in an experimental matrix composed strategically of PCB's contaminated oil on sand, to increase the contact surface between the bacteria and the contaminant. *Pseudomona alcaligenes* achieved a 33% reduction in PCB's, following by *Providencia rettgeri* with 26% and finally *Providencia stuartii* with 12 %, all in a period of 42 days. Based on these results, it was concluded that it was possible to find in our midst bacteria capable of biodegrading PCB's, making way for studies that seek to apply this method on a larger scale. It is recommended to realize researches than aim to enhance the degradation of PCB's through the use of any the bacteria found.

KEY WORDS: <PCB'S> <DIELECTRIC OIL> <BACTERIA [*Pseudomona alcaligenes*]> <BACTERIA [*Providencia rettgeri*]> < BACTERIA [*Providencia stuartii*]> < BIODEGRADE>

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Identificación del problema

Los Bifenil Policlorados (PCB's), son un conjunto de compuestos orgánicos persistentes que fueron utilizados intensamente entre 1930 y 1970, en equipos eléctricos como transformadores, condensadores, intercambiadores de calor, sistemas hidráulicos, así como también en la fabricación de pinturas y plásticos. Durante los años de 1929 y 1993 se produjo mundialmente 1.300 000 toneladas de PCB's. (MAE, 2015, pp. 25-28). Estos xenobióticos se transfieren a animales y plantas a través del suelo y agua, llegando así al punto más elevado de la cadena trófica que es el ser humano; a estos pueden verse expuestos también al inhalarlos y absorberlos por la piel, causando irritaciones cutáneas, hipersecreción de glándulas lacrimales y conjuntivitis a nivel crónico. Se le atribuye al contacto con PCB's, enfermedades como el cáncer al hígado, tracto biliar y leucemia, además de efectos hormonales y en el sistema nervioso. (OMS, 2000, pp. 11-13)

El sector eléctrico fue en su momento el mayor demandante de los aceites dieléctricos que contenían en su composición PCB's, debido a su capacidad de aislamiento térmico en los generadores, disyuntores y transformadores eléctricos, esto ha provocado que en instalaciones como las estaciones eléctricas, patios de maniobra y centrales hidroeléctricas; se almacenen estos equipos contaminados, constituyendo una fuente potencial de contaminación a los recursos suelo y agua. (MAE, 2015, p. 5).

La Central Hidroeléctrica "Alao" perteneciente a la Empresa Eléctrica Riobamba S.A (EERSA), se encuentra localizada en la parroquia Pungalá, del cantón Riobamba, provincia de Chimborazo, es el lugar donde se generan 10,4 MW/h de energía para la ciudad de Riobamba, esto demanda el uso de transformadores eléctricos, los mismos que precisaban y muchos de ellos aun utilizan este tipo de aceite. (GREEN OIL S.A, 2010, p. 4)

Existe una caracterización de los aceites dieléctricos, en la que consta a detalle la concentración de PCB's presentes y el equipo del cual proviene el aceite, todo esto como parte del Programa de Gestión racional de los aceites, equipos, sitios y desechos contaminados con PCB's en el país, acorde con los Convenios de Basilea y Estocolmo; donde se consideran aceites contaminados a aquellos que presentan una concentración mayor a 50 ppm de PCB's.

Es un hecho la existencia de aceites contaminados en el país, en forma de mezclas como el Aroclor, cuya gestión se enmarca también en la búsqueda de tratamientos amigables que permitan mitigar el efecto de estos aceites en los ecosistemas aledaños a los lugares donde fueron usados y donde actualmente se encuentran almacenados.

En este contexto, cabe buscar respuestas a las siguientes preguntas: ¿Es posible caracterizar cepas bacterianas de suelos, con potencial para degradar PCB's?, ¿Puede existir cepas de bacterias en el suelo que resistan la presencia de PCB's, para poder aislarlas?, de ser así ¿Cómo se demostraría la degradación de PCB's por parte de estas cepas de bacterias? Y ¿Cuál sería la manera de identificarlas para su posterior uso potencial?

1.2 Justificación de la investigación

A pesar de la importancia que demanda la remediación de ambientes contaminados con PCB's, el Ecuador cuenta únicamente con planes para manejarlos. Esto se debe a que existe una escasa investigación acerca de los tratamientos biológicos que pueden ser aplicados para que de una manera limpia se puedan reducir los PCB's del ambiente.

Es por ello que este estudio busca encontrar técnicas biológicas para la solución de este problema y ser un aporte técnico y práctico para futuros proyectos de investigación, pues una vez identificadas y probadas las cepas bacterianas aisladas se podrá proponer técnicas de biorremediación a partir de ésta investigación; convirtiéndose así en una guía para la recuperación de aceites contaminados con PCB's en diferentes ciudades del Ecuador.

Es importante resaltar que dentro del Plan Nacional del Buen Vivir 2013-2017, tomo I, promulgado mediante Registro Oficial Suplemento No. 78 de 11 de septiembre de 2013, y cuyas reformas que constan en el Tomo II fueron dadas por Resolución No. 2 publicadas en el Registro Oficial Suplemento No. 308 de 11 de Agosto del 2014, el objetivo 7, garantiza los derechos de la naturaleza, y dentro de su contenido se encuentra el apartado de "Contaminación Ambiental" en el que se estipula, la prevención, control y mitigación de la contaminación ambiental para mejorar la calidad de vida de toda la población ecuatoriana, asegurando de esta forma el derecho de vivir en un ambiente sano, libre de sustancias químicas peligrosas, denominación que reciben los Bifenil Policlorados, comúnmente presentes en los aceite dieléctricos que se usaban hace aproximadamente 30 años, en los transformadores eléctricos.

Existen aún aceites dieléctricos contaminados con PCB's que ponen en riesgo al ecosistema y a las personas aledañas a los lugares donde se encuentran almacenados, por dicha razón las tecnologías biológicas representa en la actualidad una alternativa limpia y eficaz, basada en el aprovechamiento de la actividad metabólica de diversas especies bacterianas, para la degradación de compuestos contaminantes, como es el caso de los PCB's; cambiando así una realidad que actualmente está perjudicando al Ecuador y al mundo entero.

Este proyecto es completamente viable, ya que se cuenta con el apoyo y consentimiento de la Empresa Eléctrica Riobamba S.A para realizar los muestreos pertinentes en la Central Hidroeléctrica “Alao” y acceder a la información necesaria. Además, mediante autofinanciamiento y el apoyo del Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA), se cuenta con la factibilidad económica y tecnológica. El equipo de trabajo guiado y asesorado por expertos en el tema, provee la factibilidad técnica para llevar a cabo este importante estudio.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Caracterizar cepas bacterianas aisladas a partir de suelos, con potencial para degradar PCB's presentes en aceites dieléctricos provenientes de la Central Hidroeléctrica “Alao” de la Empresa Eléctrica Riobamba S.A.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Aislar cepas bacterianas a partir de suelos de la Central Hidroeléctrica “Alao”, resistentes a PCB's presentes en aceite dieléctrico.
- Identificar las cepas bacterianas aisladas con potencial para degradar PCB's, a través de pruebas bioquímicas.
- Realizar una prueba, in vitro, de la capacidad de las cepas bacterianas aisladas para degradar PCB's presentes en aceite dieléctrico.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Actualmente existen tratamientos como el encapsulamiento e incineración de aceites y equipos contaminados con PCB's, pero son procedimientos que no eliminan los PCB's, solamente los transforman a compuestos muchas veces más perjudiciales, como dioxinas y furanos. En el tratamiento biológico, lo que se busca es reducir la concentración de PCB's en los aceites dieléctricos, esto se logra mediante el uso de microorganismos, que pueden actuar de dos formas: utilizando el contaminante como fuente de nutrientes, o generando enzimas, que actúan sobre la estructura clorada del anillo de bifenilo. (Castillo, 2005, pp 208 - 212)

Este hecho hace que el presente estudio adquiera el calificativo de novedoso, localmente hablando, pues a nivel mundial se han llevado a cabo algunos estudios. Uno de ellos es el tratamiento de suelos contaminados con Aroclor 1260, donde se experimentó una degradación anaeróbica seguida de una fase aeróbica, en esta última se aplicó *Burkholderia* sí, cepa LB400, y se bioestimuló todo el proceso, logrando una reducción de 59 a 20 (mg de PCB's/g de suelo). (Master, 2001)

Wolf, *et al.*, (2002), hace referencia en su artículo científico titulado "*Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments*", a ciertas condiciones al momento de aislar un microorganismo para degradar PCB's, como por ejemplo un pH ácido para el medio de enriquecimiento.

Es importante considerar, que uno de los tratamientos biológicos que ha tenido buenos resultados, consiste en un compostaje en donde se lleva a cabo una degradación anaeróbica- aeróbica. Yang Log, consiguió una degradación del 25.0 % con microorganismos enriquecidos y diversificados, potenciada con un aporte de materia orgánica, para el crecimiento microbiano. (Yang, *et al.*, 2015)

La clave de la degradación biológica de estos compuestos, radica en lograr potenciar la fase anaeróbica, una halorespiración puede ocasionar que *Dehalobium chlorocoercia* y *Burkholderia xenovorans* LB400 (aeróbica), trabajen simultáneamente para lograr una disminución del 80% en masa de PCB del 8 a < 2 mg / kg de sedimento, después de 120 días, según investigaciones realizadas en mesocosmos de laboratorio, en la Universidad de Carolina. (Rayford, *et al.*, 2013, p. 3809)

Investigaciones anteriores han demostrado que las condiciones ambientales óptimas para la degradación de PCB's, se asemejan a las de un mesocosmo en el que se coloca el sedimento que se encuentra contaminado con PCB's (Aroclor), mediante este sistema se logra condicionar adecuadamente el ambiente para la acción metabólica de las bacterias *Dehalobium chlorocoercia* DF1 y en la fase anaeróbica *Burkholderia xenovorans* LB400. (Rayford, *et al.*, 2013, p. 3810)

2.2. Marco conceptual

2.2.1 Aceite mineral

El aceite mineral se origina por la destilación de los aceites crudos del petróleo y su calidad depende del crudo original y de los procesos de refinamiento, estructuralmente comprenden cadenas de alcanos que van desde 15 a 40 carbonos en combinación de compuestos orgánicos como las parafinas. (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2009, p. 1) El sector eléctrico lo utiliza ampliamente como aceite dieléctrico, que no es más que el aceite mineral modificado a base de aditivos, para que pueda ser usado como parte del aislamiento líquido de un equipo eléctrico. Este fluido sirve para tres fines dentro del dispositivo: Proporcionar un enfriamiento eficiente, aportar rigidez dieléctrica y proteger al sistema aislante. (Pérez, 2001, p. 14). Las características de éste aceite convergen para su fin de aislamiento se detallan en el Anexo A.

El aceite dieléctrico es depositado dentro del transformador por medio del grifo de llenado, formando así parte del sistema de aislamiento líquido del equipo, en el aceite dieléctrico se bañan las bobinas, núcleos y aislantes sólidos, con el fin de evitar la

producción de llama durante la operación de la unidad. (Pérez, 2001, pp. 3-5). Cuando el aceite dieléctrico contiene una concentración mayor o igual a 50 y menor a 500 ppm de PCB, es considerado como aceite dieléctrico contaminado con PCB's. (MAE, 2016, <http://www.ambiente.gob.ec/>).

2.2.2. *Compuestos Orgánicos Persistentes (COP's)*

Son un conjunto de compuestos orgánicos que presentan gran resistencia a la degradación debido a su estructura muy estable. El Convenio de Estocolmo establece que los COP's: "Tienen propiedades tóxicas, son resistentes a la degradación, se bioacumulan y son transportados por el aire, el agua y las especies migratorias a través de las fronteras internacionales y depositados lejos del lugar de su liberación, acumulándose en ecosistemas terrestres y acuáticos" (Convenio de Estocolmo, 2001, p. 1). Dentro de este grupo, se encuentran doce de los compuestos más peligrosos del mundo, por lo que se les ha denominación "*docena sucia*", entre ellos tenemos: Dioxinas, Furanos, Bifenilos Policlorados (PCB's), pesticidas como Hexaclorobenceno, DDT, Clordano, Heptacloro, Aldrin, Dieldrin, Endrin, Toxafeno, Mirex. (Recalde & Zorrilla, 2008, pp. 44-45)

Los COP's comparte similitud en su estructura, pues la mayoría de estos compuestos son moléculas orgánicas cíclicas cloradas. (Arbeli, 2009, p. 56) Al ser compuestos peligrosos tanto para la vida como para el ambiente, entidades internacionales han determinado sus características, entre las que se considera: persistencia (vida media es superior a dos meses en el agua y a seis meses en el suelo o sedimentos, bioacumulación como el factor de bioconcentración del compuesto es superior a 5.000 en las especies acuáticas, el log Kow es superior a 5 o existe preocupación por elevada ecotoxicidad causada en una especie (Convenio de Estocolmo, 2001, p. 54), toxicidad que son los efectos que estos compuestos pueden desencadenar a bajas concentraciones y estar presentes por varios años tras su exposición (Ministerio de Agricultura, alimentación y Medio Ambiente de España, 2012, p.14) y transporte a larga distancia (concentraciones de los productos en sitios distantes de la fuente de liberación (Convenio de Estocolmo, 2001, p. 54))

2.2.3. *Mecanismos y rutas de degradación de los COP's*

Aun sabiendo que estos compuestos son originados sintéticamente, se ha podido encontrar en los últimos años más de 3.000 moléculas órganocloradas como el bromoformo formada por *Asparagopsis taxiformis*, una alga marina localizada en Hawai y contiene más de 100 compuestos haloorgánicos, principalmente bromoformo, otra alga es *Bonnemaisonia hamifera*, que contiene varios heptanones bromados que pueden ser precursores del bromoformo (Gribble, 2002, p. 289). El clorometano es producida por los tubérculos de patata, y lo contiene una planta tailandesa *Arundo donax*. (Gribble, 2002, p. 291). Por ende, para su regulación, son conocidas numerosas bacterias y hongos que pueden degradar compuestos haloorgánicos permitiendo establecer diversos mecanismos y rutas metabólicas bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. (Alexander, 1999, pp. 138-139)

Existen tres rutas metabólicas más estudiadas para degradar COP's, las dos primeras se relacionan con la deshalogenación oxidativa y deshalogenación hidrolítica. La etapa clave en la degradación es la incorporación de uno o dos grupos de hidroxilos. En la deshalogenación oxidativa, la fuente de oxígeno es molecular (O_2) y por tanto ocurre estrictamente en condiciones aeróbicas, mientras que en la deshalogenación hidrolítica la fuente del oxígeno es la molécula de agua y puede ocurrir bajo diversas condiciones rédox, según el requerimiento del aceptor de electrones de la bacteria responsable por esta reacción (respiración aeróbica, desnitrificación, entre otros). (Zhao, 2007, pp. 313-317)

La tercera ruta es la deshalogenación reductiva, aquí el átomo de cloruro se reemplaza por un átomo de hidrógeno y dos electrones, ésta reacción puede ocurrir en condiciones aeróbicas o anaeróbicas y muchas veces el compuesto haloorgánico es el aceptor final de electrones en respiración anaeróbica, donde la energía liberada en la oxidación del donador de electrones se utiliza para formar gradiente de protones y posteriormente para sintetizar ATP. Este proceso se conoce con el nombre de halorespiración o deshalorespiración y las bacterias implicadas en él normalmente son anaeróbicas obligatorias. (Holliger, *et al.*, 1999, pp: 384-385)

Según Holliger, *et al.* (1999, p. 384), para la degradación de un COP se puede considerar dos rutas metabólicas: para la degradación y sus requerimientos; y de la fisiología de la

bacteria que produce la degradación. Para esto consideramos factores como: La función del contaminante en la reacción (fuente de carbono, donador de electrones, aceptor final de electrones e inhibidor), sustratos adicionales de la reacción (oxígeno), el donador y aceptor final de electrones para capturar energía, condiciones óptimas para el crecimiento de los microorganismos que degradan el contaminante (temperatura, pH), las características del sitio contaminado (pH, nutrientes y temperatura).

2.2.4. Bifenil Policlorados (PCB's)

Son compuestos orgánicos aromáticos constituidos por átomos de carbono, cloro e hidrógeno, como se aprecia en la Ilustración 1. Su fórmula general es: $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ (CONAMA, 2004, p. 3) y se forman por la sustitución por cloro en una o más de las diez posiciones de la molécula de bifenilo, resultando así 209 combinaciones posibles de estos átomos, denominados *congéneres*. (MAE, 2015, p. 25).

Los congéneres más tóxicos presentan una conformación “co-planar”. Es decir no tiene cloros en posición orto, por el contrario, tienen cloros en las dos posiciones *para* y, por lo menos, en las dos posiciones *meta*. Estas moléculas se parecen estereo-química y toxicológicamente a 2, 3,7, 8-tetraclorodibenzo-p-dioxin (TCDD) y, por lo tanto, se denominan “como-dioxin”. (Tandlich, *et al.*, 2001, pp. 1547-1555)

Entre los PCB's más comunes se encuentra el AROCLOR, que es una mezcla de congéneres de PCB's, que se produjo en los años de 1930 a 1979. Dicha mezcla se obtiene a través de la cloración progresiva de lotes de bifenilo hasta que se alcanza un determinado porcentaje de cloro. Las mezclas de Aroclor se nombran en base a dos sufijos, por ejemplo el Aroclor 1254, indica que: la mezcla tiene aproximadamente 54% de cloro en peso, el número 12 hace referencia al número de átomos de carbono en los anillos de fenilo (para PCB esto es 12). (EPA, 2013, p. 1). En la Tabla 1 se presenta algunas de las propiedades características de las mezclas de Aroclor.

Tabla 1. Propiedades de diferentes mezclas de Aroclor.

AROCLOR	1242	1254	1260
<i>Apariencia</i>	Aceite claro, móvil	Aceite viscoso, amarillo claro	Resina Pegajosa amarilla clara
<i>Peso Molecular [g/mol]</i>	266,5	328	375,7
<i>Densidad [g/cm³, 25°C]</i>	1,35	1,50	1,58
<i>Solubilidad [mg/L, 24°C]</i>	0,34	0,057	0,08
<i>Presión de vapor [mm Hg, 25°C]</i>	4,06 x 10 ⁻⁴	7,71 x 10 ⁻⁵	4,05 x 10 ⁻⁵
<i>Constante Ley de Henry [atm*m³/ mol, 25 °C]</i>	5,2 x 10 ⁻⁴	2,0 x 10 ⁻³	4,6 x 10 ⁻³
<i>Koc</i>	6.300	530.000	6700.000
<i>Kow</i>	5,6	6,5	6,8

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen

Fuente: US EPA Interim Draft, 2000

2.2.4.1. Características de los PCB's

Las características de estos compuestos varían ampliamente con el número de cloros que contengan en su composición, los congéneres con uno o cuatro átomos de cloro son líquidos aceitosos y los PCB altamente clorados son grasas y ceras. (MAE, 2015, p. 26). Los PCB's son muy resistentes a diversos oxidantes, al oxígeno, metales activos y otros productos químicos (Seeger, *et al.*, 1995, 2654). Además son sustancias apolares y no inflamables, químicamente inertes y termoestables, no los ataca la luz y son difícilmente biodegradables, su vida media varía entre 10 días a un año y medio. (MAE, 2015, p. 25) Presentan alta estabilidad ante el calor, tienen excelentes propiedades dieléctricas y casi siempre se presentan como mezclas Aroclor. (Recalde & Zorrilla, 2008, p. 34). En el Anexo B se encuentran a detalle, las características físico químicas de los PCB's.

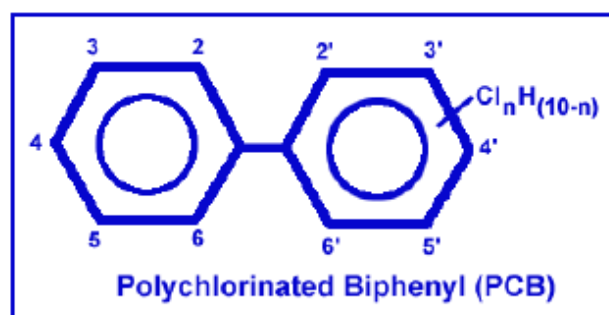


Ilustración 1. Estructura de los Bifenil Policlorados

Fuente: Recalde & Zorrilla, 2008

Los PCB's son constituyentes de una gran cantidad de artículos de uso común como: Plastificantes, sellantes, pinturas, líquidos hidráulicos, aceites dieléctricos, lubricantes especiales, aceites de bombas de vacío, entre otros. La función principal del PCB's en estos artículos fue de otorgarles inflamabilidad y estabilidad térmica, en el caso de los aceites dieléctrico y de algunos lubricantes actuaban como refrigerantes del sistema. (MAE, 2015, pág. 26)

2.2.4.2. PCB's en el ambiente

Los PCB's ingresan pueden ingresar al aire, agua y suelo debido a derrames accidentales o fugas durante el transporte o mal almacenamiento al no degradarse con facilidad, permanecen en el ambiente por un largo tiempo. En el caso del aire una vez ahí, pueden viajar varias distancias y ser depositados en lugares distantes del lugar de vertido. Debido a su combustión incompleta, los PCB's se emiten a la atmosfera junto con gases de combustión y regresan en la lluvia, granizo, nieve o partículas secas. Son xenobióticos, lipofílicos, pseudohormonas, y bioacumulables. (MAE, 2014, <http://www.ambiente.gob.ec>)

En su presentación "Conciencia sobre los PCB's", el Ministerio del Ambiente del Ecuador, (2014, p. 36) indica que los PCB's quedan retenidos en organismos vivos y acumulados durante el tiempo, como indica la Ilustración 2, aseverando que la concentración es mayor en organismos más grandes.

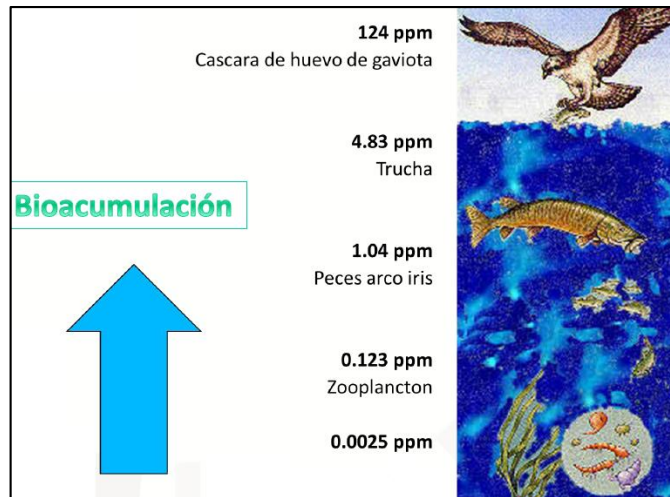


Ilustración 2. Bioacumulación de PCB's en organismos.
Fuente: Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2014

2.2.4.3. *Vías de exposición*

Los seres humanos están expuestos a los PCB's principalmente a través del aire, el agua potable y los alimentos (MAE, 2014, <http://www.ambiente.gob.ec>) como plantas y animales como carne, pescado y aves de corral. Sin embargo, puede ser también inhalado o absorbido por medio de la piel. La ingesta de PCB entre los adultos alcanzó su valor máximo a finales de la década de los setenta y descendió a niveles más bajos en la década de los noventa. (Green Facts, 20015, <http://www.greenfacts.org/es/pcb/>) Los bebés pueden estar expuestos a los PCB's presentes en la leche de su madre, estos niveles en la leche materna también descendieron desde la década de los setenta. La población en general está expuesta a niveles bajos de PCB's presentes en agua e incluso en el aire que se respira. (Green Facts, 2015, <http://www.greenfacts.org/es/pcb/>)

2.2.4.4. *Efectos de los PCB's sobre la salud*

Una vez que los PCB's entran en el cuerpo, atraviesan las membranas celulares pasando a los vasos sanguíneos y al sistema linfático, las mayores concentraciones de PCB's suelen encontrarse en el hígado, tejido adiposo, piel, cerebro y en la sangre, estos compuestos se transforman en sustancias con una estructura química modificada que no

se excretan fácilmente, sino que quedan retenidas y se acumulan en ciertos tejidos y fluidos corporales. Algunas veces, pueden transformarse en sustancias que se combinan con otras, permitiendo su excreción en la orina y heces. En el caso de las mujeres embarazadas los PCB's pasan a la sangre del cordón umbilical, placenta y a la leche materna. (Green Facts, 20015, <http://www.greenfacts.org/es/pcb/>)

Los efectos adversos a la salud asociados con la exposición a PCB's se dan a nivel del sistema inmunitario y reproductivo, provocando como consecuencia menor fecundidad en las mujeres y una disminución del número de espermatozoides móviles en los hombre, así también uno de los efecto más notorios de los PCB's en la salud se da sobre la piel produciendo acné, irritaciones cutáneas, hipersecreción de glándulas lacrimales y conjuntivitis, a nivel gastrointestinal en el que la exposición a este contaminante puede ocasionar cáncer al hígado y tracto biliar. Durante el embarazo y la lactancia la exposición a los PCB's ocasiona un retraso en el crecimiento y el desarrollo durante la infancia. (Green Facts, 20015, <http://www.greenfacts.org/es/pcb/>)

2.2.5. Determinación De PCB's

Según Andino (2013, p. 25), señala que existen dos formas para determinar PCB's: Cromatográfica (gases, líquido y fluido supercrítico) y no Cromatográfica (métodos químico, métodos espectroscópicos, y pruebas colorimétricas).

2.2.5.1. Análisis por Cromatografía de gases

Es una de las técnicas más usadas por su precisión, ésta cromatografía permite determinar la concentración de compuestos volátiles, semivolátiles y térmicamente estables a temperaturas de 350 y 400°C. (Ozores, 2013, <http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografa-de-gases>). Inicialmente la muestra se volatiliza y se inyecta a la cabeza de una columna cromatográfica, una vez en el inyector la muestra entra en contacto con la fase móvil que es un gas portador, el cual no interactúa con el analito, solamente lo

moviliza por la columna, una vez ahí, los compuestos que forman el analito empiezan a separarse, al final de la columna se encuentra un detector para el caso de la cromatografía de gases es un detector de ionización de llama (FID), el cual capta la señal que produce la reacción del compuesto en presencia de la llama, finalmente se obtienen picos de absorbancia que permitirán determinar la concentración de los diferentes compuestos. (Corrales, 2014)

2.2.5.2. Pruebas Colorimétricas

Las pruebas colorimétricas que se realizan a los aceites dieléctricos para determinar la presencia cualitativa de PCB's se llevan a cabo mediante la utilización de Kits de pruebas rápida, denominadas Clor-N-Oil. Estas pruebas se fundamentan en la detección del cloro, mediante una serie de reacciones instantáneas. El kit de Clor-N-Oil 500, permite reconocer si el aceite dieléctrico en estudio se encuentra en un rango mayor a 50 y menor a 500 ppm de PCB's, en base a la coloración que adquiere luego de las reacciones. (CONELEC, 2012, pp. 31-32)

2.2.6. Métodos de descontaminación, tratamiento, destrucción y eliminación de PCB's

Desde la década de los 70 se determinó la toxicidad y los efectos nocivos de los PCB's sobre el ambiente, a partir de esta fecha se han desarrollado varias investigaciones para destruir o transformar estos compuestos a productos menos nocivos al ambiente. Sin embargo, no hay una técnica que se haya posicionado como la mejor alternativa en cuanto a efectividad y costos. Los métodos más comunes de eliminación de los PCB's son:

2.2.6.1. Incineración

La incineración es la oxidación de un compuesto a altas temperaturas hasta transformarlo en CO_2 , H_2O y otros residuos inorgánicos que pueden ser descargados al ambiente con bajos riesgos tóxico. Para el proceso los desechos deben estar expuestos a atmósferas oxidantes a alta temperatura, comúnmente se utiliza aire y un hidrocarburo como combustible, aunque puede usarse el poder calorífico de los aceites contaminados con PCB's, siempre que esto no degrade la condición oxidante a alta temperatura, durante el proceso se genera ácido clorhídrico y otros varios óxidos, estos compuestos acídicos gaseosos deben removerse de los efluentes antes de ser descargados a la atmósfera. Las condiciones de operación mínimas para la cámara de combustión principal, sugeridas para lograr la destrucción de los PCB's, son: Tiempo de residencia: 2 segundos, a 1200°C y un exceso de oxígeno del 3% y un tiempo de residencia: 1.5 segundos, a 1600°C y un exceso de oxígeno del 2%. (Lopera y Aguirre, 2005, p.78)

2.2.6.2. Métodos Químicos

Son procesos basados en reacciones químicas para destruir los PCB's se diferencian de los procesos de incineración en que no necesitan de altas temperaturas para que la reacción ocurra, sino que estos procesos se llevan a cabo gracias al potencial de los compuestos químicos para reaccionar. Este método implica la destrucción de PCB's que contaminan el aceite mineral, y aunque destruyen los PCB's contenidos en el aceite, no destruyen el aceite en sí. (Lopera y Aguirre, 2005, p.79)

El proceso químico más común es la deshalogenación que consiste en sustituir los átomos de cloro que se encuentran unidos covalentemente en las moléculas, por átomos de hidrógeno u otros átomos no halógenos, eliminando su toxicidad. Una vez que los aceites estén deshalogenados total o parcialmente pueden ser incinerados o depositados en vertederos. (Lopera y Aguirre, 2005, p.79) El reactivo más usado para este proceso es una sal de metal alcalino (sodio o potasio) de un alcohol polimérico. Un grupo $-\text{OH}$ reemplaza un átomo de cloro, y así se forman sales de NaCl o KCl . Este proceso se lleva a cabo a temperaturas por encima de 120°C en presencia de hidróxido de potasio. Este proceso funciona mucho mejor para los PCB's muy clorados. (Baird, 2001, p.540)

2.2.6.3. Métodos Físicos

Los métodos físico químicos para el manejo de PCB's no son tratamientos que lleven a su destrucción a diferencia de los tratamientos anteriores. Consisten en la sustitución del aceite aislante por uno nuevo (retrolenado) y para que sea tratado como residuo con PCB's, es decir Los PCB's todavía deben tratarse o disponerse por otro método apropiado. (Lopera y Aguirre, 2005, p.79)

Estas técnicas varían desde el simple drenado del transformador lleno con aceite contaminado hasta la destilación de los PCB's del fluido de transformador. (Lopera y Aguirre, 2005, p.79) Además existen autoclaves móviles que usa el vapor generado al calentar solventes orgánicos para remover PCB's de matrices solidas como los equipos de Askarel o transformadores. (Manual de manejo de PCB's para Colombia, 2001, http://www.crc.gov.co/files/Respel/Manual_PCBs.pdf)

2.2.6.4. Métodos con Energía Radiante

Consiste en la aplicación de energía radiante para impulsar una reacción química, y por tanto, la destrucción de los PCB's. En el proceso la energía radiante interactúa directamente con la molécula de PCB o con una especie intermedia que subsecuentemente la ataca. En los dos casos, la temperatura no es importante, pues operan desde temperaturas cercanas a la del ambiente hasta aquellas que permiten reducir los desechos a fracciones moleculares básicas. (Lopera y Aguirre, 2005, p.79)

2.2.6.5. Métodos Biológicos

Es la alternativa más amigable con el ambiente, pues propone técnicas de biorremediación basadas en la utilización de cepas bacterianas, ingeniería genética, bioaugmentación e ingeniería enzimática para degradar PCB's. Los bifenilos mono y diclorados pueden ser biodegradados por bacterias en cuestión de días si se trabajan en concentraciones bajas. (Lopera y Aguirre, 2005, p.79)

2.2.7. Biorremediación

Es la utilización de organismos vivos, componentes celulares y enzimas libres con el fin de mineralizar o transformar parcialmente un contaminante, principalmente se hace uso de microorganismos mediante las reacciones que forman parte de sus procesos metabólicos. Existen muchas técnicas de biorremediación como: bioaumentación, bioestimulación, landfarming, compostaje entre otras, además dependiendo de la disposición de oxígeno, la biorremediación puede darse en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. (Gualoto, 2012, p.2)

2.2.7.1. Ventajas y desventajas de la biorremediación

a. Ventajas

La biorremediación ofrece una solución más simple y completa en comparación a las técnicas fisicoquímicas, si se compara efectividad las técnicas de biorremediación estas pueden llegar a lograr la detoxificación completa, además de la facilidad de aplicación *in-situ* o *ex – situ*, debido a que no necesitan componentes mecánicos o estructuras alternas, son poco invasivas reduciendo el riesgo al momento de aplicar la técnica. En la biorremediación la transferencia de contaminante de un medio a otro es mínima, logrando una degradación final. Los residuos generados tras la aplicación de una técnica de biorremediación generalmente no son tóxicos. (Orosco & Soria., 2008, p. 47)

b. Desventajas

Extrapolar las condiciones de laboratorio a campo o planta piloto resulta muy difícil, generalmente son técnicas aplicables solo a compuestos biodegradables, al ser tratamientos innovadores los porcentajes de eficiencia son variables, así como también

los tiempo de degradación. Al trabajar con organismos, se deben tener en cuenta el riesgo biológico que se puede presentar, debido al uso de bacterias o enzimas que puedan reaccionar desfavorablemente con los contaminantes o el medio en tratamiento. (Orosco & Soria, 2008, p. 48)

2.2.8. Bacteria

Es un organismo microscópico, unicelular procariota, es decir que puede ser observada por medio de un microscopio, está formada por una única célula autónoma y no posee membrana nuclear. Aunque las formas de las bacterias son muy diversas se las ha agrupado tres grupos: alargadas (bacilos), esféricas (cocos) y en forma espiral (espirilos). A su vez, estas pueden asociarse en grupos, formando parejas (diplococos), cadenas (estreptococos) y racimos (estafilococos). (Jáuregui & Chávez, 2006, pág. 33) La forma de las bacterias es dada gracias a una pared celular rígida que está constituida por una sustancia llamada peptidoglicán que brinda a la bacteria una estructura mecánica fuerte. (García, 2004, p. 46)

2.2.8.1. Cepa Bacteriana

Una cepa es un conjunto de células homogéneas provenientes de la reproducción de una célula inicial única, aislada y purificada. Específicamente, una cepa proviene de un mismo antecesor común por lo que poseen la misma información genética. La estructura y actividad biológica simple, rápida reproducción y ciclo de vida corto de las bacterias permiten aplicarlas en procesos de biotecnología y por su capacidad de resistir a compuestos ambientales tóxicos y en muchos casos integrarlos en su metabolismo son usadas en la biotecnología ambiental. (Winn, 2006, p. 163)

2.2.8.2. Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas

La constitución de la pared celular que cubre a las bacterias las divide en dos grandes grupos: Bacterias Gram Positivas y Bacterias Gram Negativas. Esta división está basada en el método de tinción diferencial desarrollado por el bacteriólogo Hans Christian Gram. Las bacterias, al ser frotadas y fijadas con calor en un portaobjetos, se tratan con colorante azul (Cristal Violeta). Se añade a continuación yodo más ioduro potásico (Iugol) para que junto con el cristal violeta formen un complejo insoluble en agua, pero sí en un solvente orgánico como la acetona. (Espinal, 2005, p. 14) Al aplicar alcohol cetona a las bacterias teñidas, estas pueden decolorarse o no. Las bacterias Gram Positivas, no se decoloran debido a que cuentan con una pared gruesa de peptidoglicano con pocos lípidos, que impide el ingreso del alcohol que pudiera lavar el colorante. (Rodríguez E., 2005, p. 63)

Por otra parte, las bacterias Gram negativas cuentan con una pared de peptidoglicano más delgada y está formada principalmente por lípidos que la hacen más porosa, permitiendo el paso del alcohol para decolorar la bacteria. Por último se puede teñir la muestra con un colorante de contraste como la safranina. Para observar mejor el cambio de color. (Macarulla & Goñi, 1994, p. 161) La tinción Gram además de clasificar bacterias Gram positivas y negativas, permite observar la pureza de la colonia de donde se tomó la muestra, esta colonia comúnmente proviene de un proceso de aislamiento y purificación.

2.2.8.3. Crecimiento Microbiano

Se entiende como el incremento celular de una población microbiana. La capacidad de los microorganismos de transformar compuestos orgánicos e inorgánicos en biomasa y productos metabólicos conduce a que cada célula aumente de longitud y de diámetro hasta que se dé el proceso de división celular. Un medio de cultivo apropiado, fuente de carbono, nitrógeno, sales y otros factores de crecimiento condicionan el proceso de crecimiento celular, ya que el proceso continúa hasta que el sustrato limitante se agota y el crecimiento se detiene, además el crecimiento microbiano puede cesar por la acción de un inhibidor producida por el propio microorganismo. (Doménech, 2014)

2.2.8.4. Bacterias como degradadoras de PCB's

Para la biorremediación es importante saber que no se tratará un compuesto específico, sino una mezcla de congéneres. La degradación secuencial anaeróbica-aeróbica es especialmente importante para tratar PCB's, ya que los congéneres con mayor número de cloros se transforman exclusivamente en condiciones anaeróbicas en procesos de deshalogenación reductiva y congéneres de menor número de cloros, se degradan exclusivamente en condiciones aeróbicas (Abraham, 2002, pp. 246-253)

En un estudio realizado por Pieper (2005), se aislaron bacterias degradadoras de PCB's de diversos géneros tales como *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Comamonas*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus* y *Bacillus*. Aquí, las bacterias aisladas no representan la comunidad nativa o los degradadores importantes del suelo. Al analizar el suelo con métodos independientes de cultivo se mostró que el 73% de los aislamientos fueron *Rhodococcus ssp*, sin embargo los géneros *Pseudonocardia*, *Kribella*, *Nocardiodes* y *Sphingomonas* resultaron ser las degradadoras dominantes de bifenil.

2.2.8.5. Ruta de degradación de los PCB's

En la Ilustración 3 se puede evidenciar la acción bacteriana, el bifenil se convierte en ácido benzoico y en ácido 2 hidroxipenta-2,4-dienoico. Este último, se transforma, a su vez, en acetil-Co-A y piruvato que alimentan el ciclo de Krebs de las bacterias. Para muchas bacterias el producto final de la degradación de bifenil o PCB es el benzoato o el clorobenzoato respectivamente, mientras que otras bacterias pueden metabolizar también benzoato y clorobenzoato. (Holliger, *et al.*, 1999, p. 383-398).

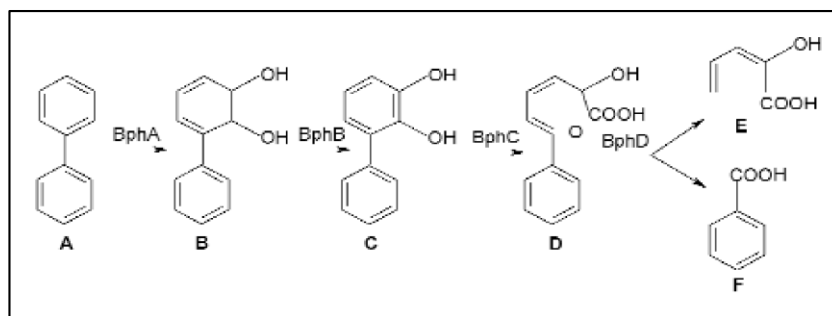


Ilustración 3. Ruta de degradación del Bifenilo

Fuente: Act. Biológica. Colombia, 2008

2.2.8.6. *Tiempos de degradación de PCB's*

Payne et al, (2013, pp. 3807–3815) aseguran que la degradación de PCB's (Aroclor) consiste en secuencia de fases anaeróbicas (por *Dehalobium chlorocoercia*) y aeróbicas (por *Burkholderia xenovorans*, *Pseudomonas* strain LB400), sus estudios han determinado una degradación del 80 % de masa de PCB's, en un medio enriquecido con este compuesto, durante un periodo de 365 días. El 56% de la degradación es realizada por la fase anaeróbica durante los 120 primeros días, por ende 24% restante corresponde a la fase aeróbica que duró 245 días restantes.

Otro factor importante es la temperatura. Se ha estudiado el uso de un sistema de biopelículas desarrolladas sobre *Opuntia imbricata*, para degradar PCB's a distintas temperaturas y los resultados fueron favorables en el rango de 20 a 40 °C, siendo 30 °C la óptima con un 96 % de biodegradación de PCB's totales, en un tiempo de 480 horas. (De la Garza, et al., 1997, pp. 23)

2.2.9. *Tratamiento In Vitro*

2.2.9.1. *Matriz de tratamiento*

Cualquier medio sólido químicamente inerte, que tenga la capacidad de retener el agua y los nutrientes necesarios, sin reaccionar con ellos o absorberlos, que permita el crecimiento de microorganismos y evaluar el comportamiento del organismo frente a

otras sustancias aplicadas, además que provea una buena superficie de contacto. (Calderón, 2001, http://www.drcalderonlabs.com/Publicaciones/Los_Sustratos.htm). En la Ilustración 4 se muestra las proporciones adecuadas para un sustrato ideal.



Ilustración 4. Matriz experimental adecuada
Fuente: Calderón, 2002

La arena de sílice (de río), es un conjunto de partículas disgregadas, cuyo diámetro varía entre 0,063 y 2 mm. Presentan una severa deficiencia de fósforo, su contenido en carbonato de calcio es inferior al 20%. Entre las propiedades físicas de este material, se considera: Tamaño de grano (0,5 - 2.0 mm), porosidad total (38-42% vol.), capacidad de aire (5-20), agua fácilmente disponible (AFD 15-35 % vol.), agua de reserva (AR 1-2 % vol.), agua difícilmente disponible (ADD 0.1-0.5 % vol.) y capilaridad buena. (Calderón, 2001, http://www.drcalderonlabs.com/Publicaciones/Los_Sustratos.htm).

2.2.10. Caracterización bacteriana

La caracterización de microorganismos se realiza en dos niveles:

2.2.10.1. Características microscópicas

Determina la forma de agrupación y estructura de células, mediante las tinciones, especialmente Gram, en la que se conoce si la cepa en cuestión está formada por bacilos

por su coloración rosadas (Gram negativos), o cocos por su coloración azul (Gram positivos). (Fernández, *et al.*, 2010, p. 4)

2.2.10.2. Características macroscópicas

Determina su morfología, para lo cual es necesario trabajar con un cultivo puro, es decir que la colonia provenga de una misma célula, dentro de las características morfológicas que se examinan. Lene (2012, p. 21) se considera:

- Tamaño: Rodríguez (2011, p.14) asegura que se pueden distinguir superficialmente los siguientes tamaños: Pequeña o puntiformes (Aquellas bacterias de diámetro ≤ 1 mm), medianas (bacterias de hasta 4 mm de diámetro) y grandes (para bacterias con diámetros mayores a 4mm).
- Forma: Puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide o fusiforme.
- Elevación: Plana, elevada, convexa.
- Margen: Entero, ondulado, lobulado.
- Coloración: Producción de un pigmento característicos del microorganismo.

2.2.10.3. Identificación de bacterias mediante pruebas bioquímicas

Esta identificación bacteriana se fundamenta en la actividad metabólica o bioquímica que expresan las bacterias en determinados medios de cultivo. Las pruebas que evalúan la presencia de una enzima preformada suelen manifestar su respuesta en cuestión de segundos y horas, como es el caso de la catalasa. Por otra parte las pruebas que generalmente se aplican para la identificación requieren del crecimiento del microorganismo con una incubación precisa de 18 a 48 horas. Entre estas pruebas tenemos:

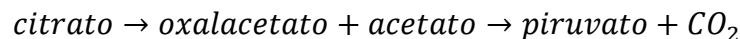
Agar de hierro de Klinger, citrato, Manitol, Lisina, Úrea, y Motilidad. (Fernández, *et al.*, 2010)

a. Prueba del Citrato

Fundamento

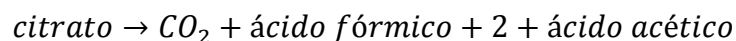
Mac Fanddin (2009, pp 42-44), señala que esta prueba permite determinar la capacidad de un microorganismo para utilizar el citrato como única fuente de carbono y sales de amonio como única fuente de Nitrógeno en sus funciones metabólicas.

El piruvato es un compuesto muy importante para la energía celular, una forma de suministrarlo a la célula es por medio de la reacción de citrato, mediante la reacción:

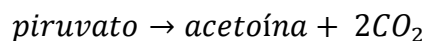
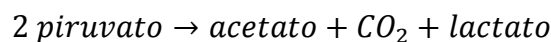


Dependiendo del pH del medio, el citrato se metaboliza en:

pH básico:



pH ácido:



Resultado

Positivo: En dos casos:

- a) Si existe crecimiento aunque no haya cambio de color
- b) Si el crecimiento está acompañado de cambio de color de verde a azul intenso en el pico de flauta.

Negativo: No hay crecimiento y el medio de cultivo es verde



Ilustración 5. Resultados de pruebas de Citrato

Fuente: Balón, Lucia et al, 2003

Microorganismos diferenciados

Mac Fanddin (2009), asegura que con base a los resultados se pueden distinguir, las siguientes bacterias:

Positivo

Salmonella

Arizona

Citrobacter

Enterobacter

Klebsiella

Serratia licuefaciens

Pseudomonas cepacia

Negativo

Edwarsiella

Yersinia enterolítica

Escherichia coli

Shigella

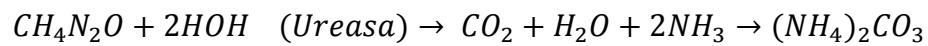
Otras especies de Moraxella

Proteus morgani

b. Prueba de Ureasa

Fundamento

La ureasa es una enzima que se encarga de desdoblar la urea en moléculas de amoníaco, por lo tanto esta prueba determina si el organismo en cuestión posee esta capacidad. (Mac Fanddin, 2009, p. 235)



Resultado

Es positivo si hay crecimiento y cambio de color del medio a rojo en el pico de flauta, debido a la acción alcalina, debido a la degradación de pequeñas cantidades de urea. Es negativo, **si** el color del medio inicial se mantiene. (Balón, *et al.*, 2003, pág. 71)



Ilustración 6. Resultados para la prueba de ureasa

Microorganismos identificados

Mac Fanddin (2009), determina que la prueba permite diferenciar los organismos *Proteus* rápidamente ureasa positivos de otros miembros de las Enterobacteriaceae, existen géneros positivos retardados, así: *Klebsiella* (+) de *Escherichia* (-) y *Proteus* (+ rápido) de *Providencia* (-). Además de la identificación de: *Bacillus lentus* (+) y *Pseudomonas cepacia* (+).

c. Prueba de Lisina

Fundamento

Existen bacterias que poseen enzimas descarboxilazas específicas que son capaces de atar aminoácidos de proteínas como la L-lisina (lisina descaboxilasa), dando lugar a cadaverina y CO₂. Esta prueba mide la capacidad de los organismos para descarboxilar la lisina.

Mac Fanddin (2009), asegura que la reacción de descarboxilación es:



Resultado

Sin presencia del inóculo el Agar Lisina es de coloración violeta-rosada. Generalmente algunas bacterias producen ácido como resultado de la fermentación de la glucosa, dicho ácido vuelve al medio color amarillo, si la bacteria posee lisina descarboxilasa en el proceso de descarboxilación de la lisina se producirá una amina, la cual neutralizará el ácido producido por la fermentación de la glucosa retornando el medio a su color original violeta. (BritaniaLab, 2011, pág. 1)

- **Positiva:** Se mantiene el color violeta-rosado del medio
- **Negativa:** El medio se torna de color amarillo.

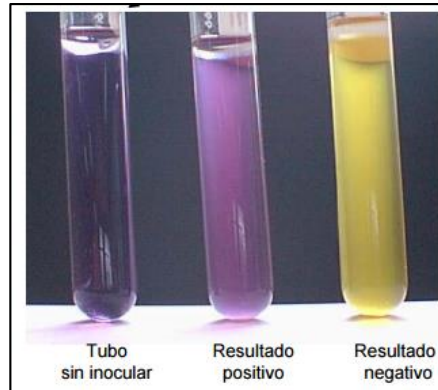


Ilustración 7. Resultados de la prueba de lisina
Fuente: BritaniaLab, 2011

Microorganismos identificados

Mac Fanddin (2009), asegura que la prueba permite diferenciar entre los géneros:

- **Positivo:** *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Arizona*
- **Negativo:** *Citrobacter*

Entre las especies:

- **Positivo:** *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter hafniae*
- **Negativo:** *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter agglomerans*

d. Prueba de Glucosa/ Lactosa

Fundamento

Evalúa la reacción del organismo al colocarlo en un medio de crecimiento básico en el que se incorporan hidratos de carbono específicos (glucosa y lactosa), con una posible producción de gas y ácido sulfhídrico (H₂S). La fermentación de los carbohidratos incorporados, producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. Existe un proceso de reducción, el tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro. (BritaniaLab, 2011, p. 1)

Tabla 2. Composición del agar hierro de Kligler.

Fórmula (en gramos por litro)	
Peptona de carne	13.0
Cloruro de sodio	5.0
Lactosa	10.0
Tripteina	10.0
Glucosa	1.0
Citrato de hierro y amonio	0.5
Tiosulfato de sodio	0.3
Rojo de fenol	0.025
Agar	15.0

Fuente: BritaniaLab, 2011

Resultados

BritaniaLab (2011, p.1) establece que, debido a los parámetros que deben ser controlados, los resultados deben interpretarse en base a las coloraciones que presenta la parte inferior del tubo así como el pico de flauta.

1. Pico alcalino/fondo ácido (Pico rojo/ fondo amarillo), el microorganismo solamente fermenta glucosa
2. Pico ácido/fondo ácido (Pico amarillo/fondo amarillo), el microorganismo fermenta glucosa y lactosa.
3. Pico alcalino/fondo alcalino (Pico rojo/ fondo rojo), el microorganismo no es fermentador de azúcares.
4. La presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo, indica que el microorganismo produce gas.
5. El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

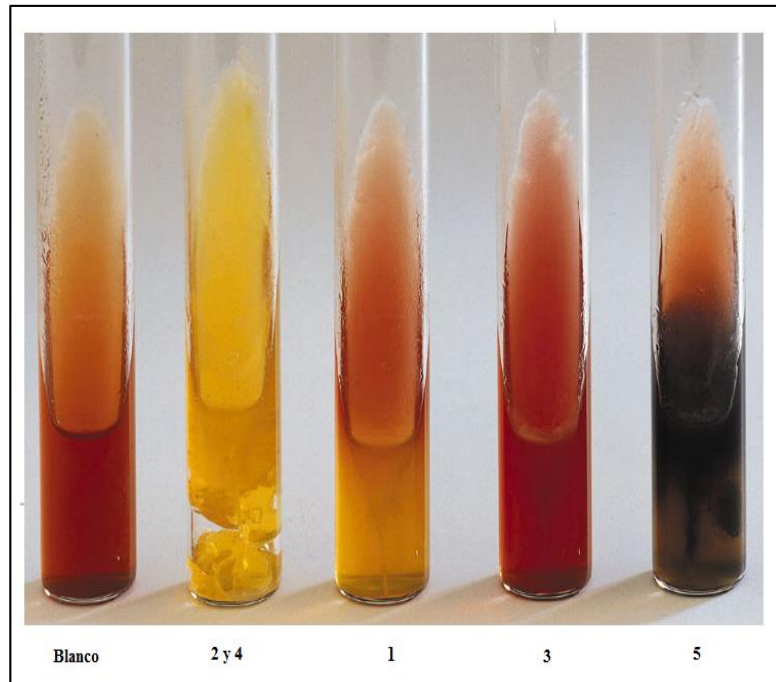


Ilustración 8. Resultados de prueba Klingler
Fuente: Science forum of Université d'Oran IGMO, 2015

Microorganismos identificados

La presencia de ácido sulfhídrico y fermentaciones de carbohidratos son características específicas de géneros o especies de Enterebacteriaceae. Mac Fanddin (2009), diferencia:

- Ácido/ácido, con/ sin gas: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*.
- Ácido/ácido, SH₂: *Citrobacter*.
- Alcalino/ácido, con/sin gas: *Escherichia (Alkalescens-Dispar)* anaerógenicas, sin motilidad, *Enterobacter hafniae*, *Serratia*, *Salmonella enteritidis*, *Shingella*, *Proteus morgani*, *Proteus rettgeri*, *Providencia*.
- Alcalino/ácido, gas, SH₂: *Edwardsiella*, *Arizona*, *Citrobacter*, *Salmonella typhi* (otras especies como: *S. enteritidis* y *S. cholerae-suis*), *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*.
- Alcalino/ alcalino o alcalino/ sin cambio: *Alcaligenes faecalis*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*.

e. **Prueba SIM (Sulfuro, Indol, Movilidad)**

Fundamento

- Producción de Ácido Sulfhídrico: Se produce una reacción de reducción cuando la bacteria reacciona con el tiosulfato constituyente del medio dando como resultado un sulfito y un sulfato. (Gonzalez, 2014, p. 59)

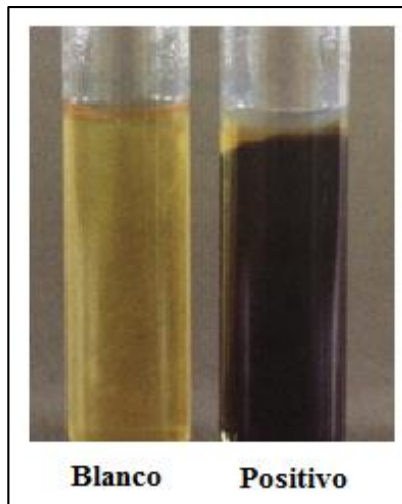


Ilustración 9. Resultado de producción de H₂S
Fuente: Baggini, 2014

- Indol: El medio está constituido por triptófano, ciertas bacterias tienen la capacidad de oxidarlo produciendo así: indol, endol e indolacético.

Resultado:

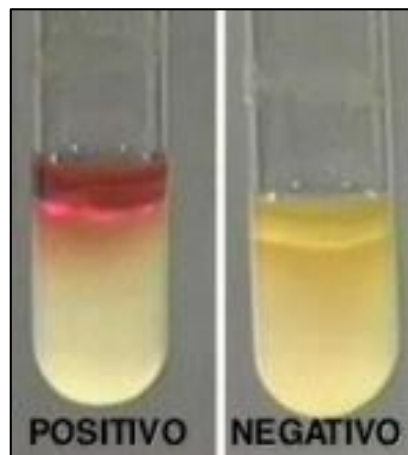


Ilustración 10. Resultado de pruebas de indol
Fuente: Zurieta, N; 2011

- Movilidad: Permite conocer si el organismo posee flagelos que le otorguen movilidad, ésta se detecta cuando se produce una turbidez alrededor de la punción de la siembra. (Gonzalez, 2014, p. 65)

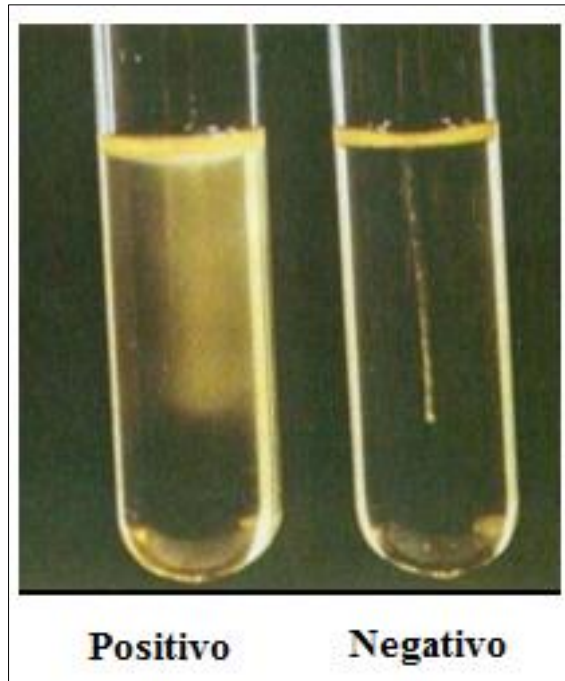


Ilustración 11. Resultado de Movilidad de la prueba de SIM
Fuente: Gonzalez, S; 2014

Microorganismos identificados

Tabla 3. Microorganismos identificados por SIM

BACTERIA	PRODUCCIÓN H₂S	PRODUCCIÓN INDOL	MOVILIDAD
<i>Salmonella typhi</i>	+/-	-	+
<i>Salmonella</i>	+/-	-	+
<i>E. Coli</i>	-	+	+/-
<i>Klebsiella</i>	-	+/-	-
<i>Enterobacter</i>	-	-	+
<i>Citrobacter</i>	+	-	+
<i>Shingella</i>	-	+/-	+/-

Fuente: Gonzalez, S; 2014

f. Prueba Manitol

Fundamento

Es una prueba específica para el aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus*, a ésta bacteria se caracteriza por su capacidad de fermentar el manitol. (Gonzalez, 2014, p. 69)

Resultado

- **Positivo:** Crecimiento y cambio de coloración del medio a amarillo, lo que indica la fermentación del manitol.
- **Negativo:** El medio mantiene el mismo color rojo.

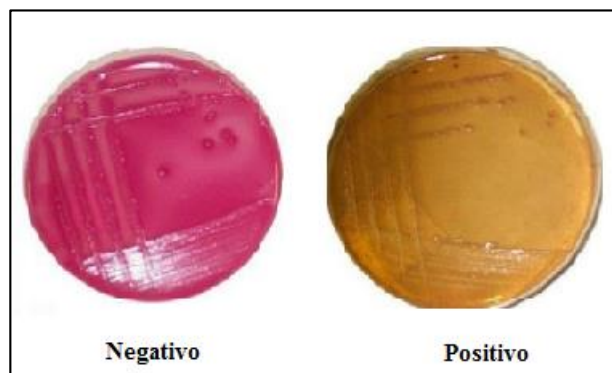


Ilustración 12. Resultado de la prueba de manitol

Fuente: Guanuchi, R; 2013

Microorganismos identificados

Mac Fanddin (2009), distingue: Positivo la presencia de *Staphylococcus aureus* y negativo no se trata de *Staphylococcus aureus*.

2.2.11. Normativa legal que regula el uso de PCB's

2.2.11.1. Constitución Política de la República del Ecuador

Art 71. “La naturaleza o Pacha Mama, donde se reproduce y realiza la vida, tiene derecho a que se respete integralmente su existencia y el mantenimiento y regeneración de sus ciclos vitales, estructura, funciones y procesos evolutivos. Toda persona, comunidad, pueblo o nacionalidad podrá exigir a la autoridad pública el cumplimiento de los derechos de la naturaleza. Para aplicar e interpretar estos derechos se observaran los principios establecidos en la Constitución, en lo que proceda. El Estado incentivará a las personas naturales y jurídicas, y a los colectivos, para que protejan la naturaleza, y promoverá el respeto a todos los elementos que forman un ecosistema” (Asamblea Constituyente, 2008, <http://www.asambleanacional.gov.ec/>)

2.2.11.2. Convenios Internacionales

- Convenio de Basilea

Trata sobre el control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación basada en un sistema de gestión ambiental, dentro de los desechos contemplados en este convenio se encuentran los COP's y aceites usados. Entró en vigencia en el Ecuador en el año de 1989 y se ratificó en 1993. (MAE, 2015, p. 3)

- Convenio de Róterdam

Su objetivo fue promover una responsabilidad compartida y esfuerzos conjuntos en la esfera del comercio internacional de ciertos productos químicos peligrosos a fin de proteger la salud humana y el ambiente, dentro de estos productos se encuentra el DDT y

algunas formas de amianto; en 1998 entró en vigencia en el Ecuador y se ratificó en el 2004. (MAE, 2015, p. 7)

- Convenio de Estocolmo

El convenio, prohíbe la producción y utilización de COP's enumerados en el mismo, así como su comercio a través de las fronteras internacionales. En el Ecuador este convenio está vigente desde el 2001 y se ratificó en el 2004. (MAE, 2015, p. 13)

2.2.11.3. Ley de Gestión Ambiental

Ley de Gestión Ambiental, R.O. No. 245 del 30 de julio de 1999, es el documento legal específico más importante relativo a la protección ambiental en el país. Abarca la prevención, control y sanción a las actividades contaminantes a los recursos naturales y entre sus objetivos está señalar los límites permisibles, controles y sanciones dentro de este campo. (Congreso Nacional, 2004, <http://www.ambiente.gob.ec/>)

2.2.11.4. Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria del Ministerio del Ambiente, Libro VI

El Texto Unificado de la Legislación Ambiental Secundaria, Decreto ejecutivo 3399 en el libro VI de la calidad Ambiental Anexo 7 contiene la lista de los productos químicos prohibidos, peligroso, su uso severamente restringido, prohíbe la importación, formulación, fabricación, uso y disposición final en el territorio ecuatoriano de varias sustancias entre ellas los PCB's por ocasionar graves problemas tóxicos para la salud humana y provocar contaminación ambiental. En el mismo libro VI, se contempla las normas para la calidad del agua y suelo, y los criterios de remediación para suelos contaminados con PCB's. (Ministerio del Ambiente de la República del Ecuador, 2007, <http://www.efficacitas.com/>)

2.2.11.5. Acuerdo Ministerial 146 “Los Procedimientos para la Gestión Integrada y Ambientalmente Racional de los Bifenilos Policlorados (PCB) en el Ecuador”

Este acuerdo se publica con Registro Oficial el 5 de Enero del 2016, siendo un paso importante para la Gestión de los PCB's, además se detalla los límites de PCB's dentro del aceite dieléctrico: Sustancia pura de PCB (Igual o mayor a 500 ppm), sustancia contaminada con PCB (Igual o mayor a 50 y menor a 500 ppm), sustancia no contaminada con PCB (Igual o mayor a 5 y menor a 50 ppm), sin PCB (Menor a 5 ppm) (MAE, 2016, <http://www.ambiente.gob.ec/>)

2.2.11.6. Manual de Procedimientos para el Manejo de Bifenilos Policlorados (PCB's) en el Sector Eléctrico Ecuatoriano

Este manual fue aprobado el 16 de abril del 2012 mediante Oficio No. MAE-SCA-2012-0534, por el Ministerio del Ambiente, elaborado por el Subcomité Técnico para la Gestión de PCB's, conformado por miembros de la CONELEC (Consejo Nacional de Electricidad) como ente regulador del sector eléctrico en el Ecuador y el Ministerio del Ambiente. Su contenido se basa en el “Plan Nacional de Implementación para la Gestión de los Contaminantes Orgánicos Persistentes en el Ecuador” del Ministerio del Ambiente y los convenios internacionales, así como también en la realidad de la actividad del sector eléctrico ecuatoriano. (Subcomité Técnico para la Gestión de PCB's, 2012, <https://maeorellana.files.wordpress.com/>)

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1. Metodología de la Investigación

Tabla 4. Metodología de la investigación

CONSIDERACIONES	NOMBRE	EXPLICACIÓN
Tipo de Investigación	Exploratoria	A nivel local, la investigación acerca de tratamiento biológico para la degradación de PCB's, es nula, pues los esfuerzos se encaminan a la gestión y disposición final de estos.
Diseño de Investigación	Cuasi Experimental.	No se toman muestras aleatorias, pero se manipulan directamente las variables para relacionarlas con los datos obtenidos.
Nivel de la investigación	Aplicativa	Porque se pretende resolver un problema actual de interés nacional.
	Explicativa	Porque se analizará la relación entre variables mediante el estudio de causa-efecto.
Enfoque	Cuantitativo	Debido a que los datos obtenidos serán medibles y observables mediante instrumentos predeterminados. Además se realizara una comparación con estudios previos.

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2015

3.2. Lugar del desarrollo de la investigación

3.2.1. Lugar de muestreo

La Central Hidroeléctrica “Alao”, se encuentra ubicada en la parroquia Pungalá a 17 Km de la ciudad de Riobamba, tiene una concesión de caudal de $4,5 \text{ m}^3/\text{s}$ provenientes de los ríos Alao y Maguazo, lo que permite generar $10,4 \text{ MW}$ de energía eléctrica. En la Ilustración 13 se presenta un mapa con la ubicación exacta de la central. (GREEN OIL S.A, 2010, p. 5)

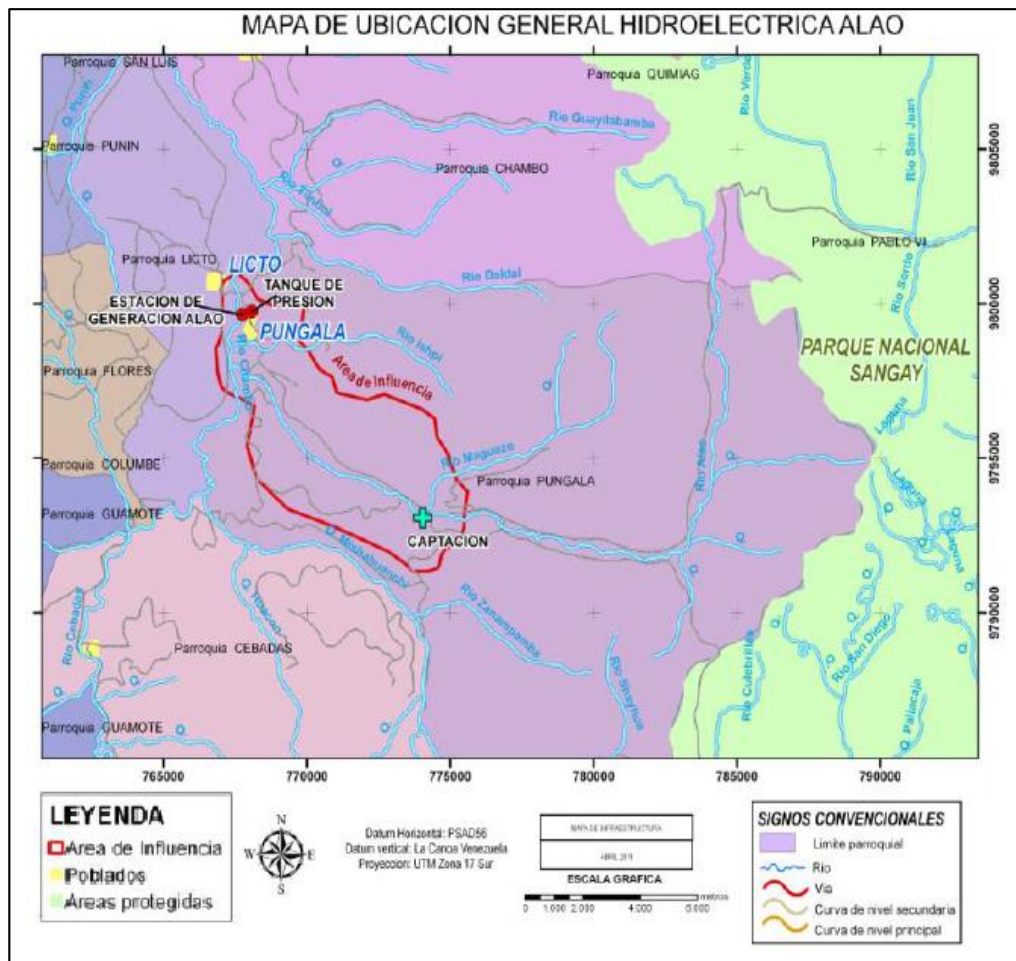


Ilustración 13. Mapa de Ubicación de la Central Hidroeléctrica "Alao"
 Fuente: GREEN OIL S.A, 2010

3.2.2 *Lugar de recolección de datos*

La presente investigación tuvo lugar en el laboratorio de Biotecnología Ambiental, localizado en el área de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias perteneciente a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

3.3. Fases de la investigación

Para una mayor comprensión de los diferentes procedimientos y análisis llevados a cabo, la Ilustración 14 presenta un diagrama de flujo con las fases de la investigación.

3.3.1. *Fase I: Caracterización del aceite dieléctrico*

En esta investigación se trabajó con dos muestras de aceite dieléctrico provenientes de distintos transformadores de la EERSA. Fue necesario caracterizar cada muestra de aceite, en cuanto a su contenido de PCB's.

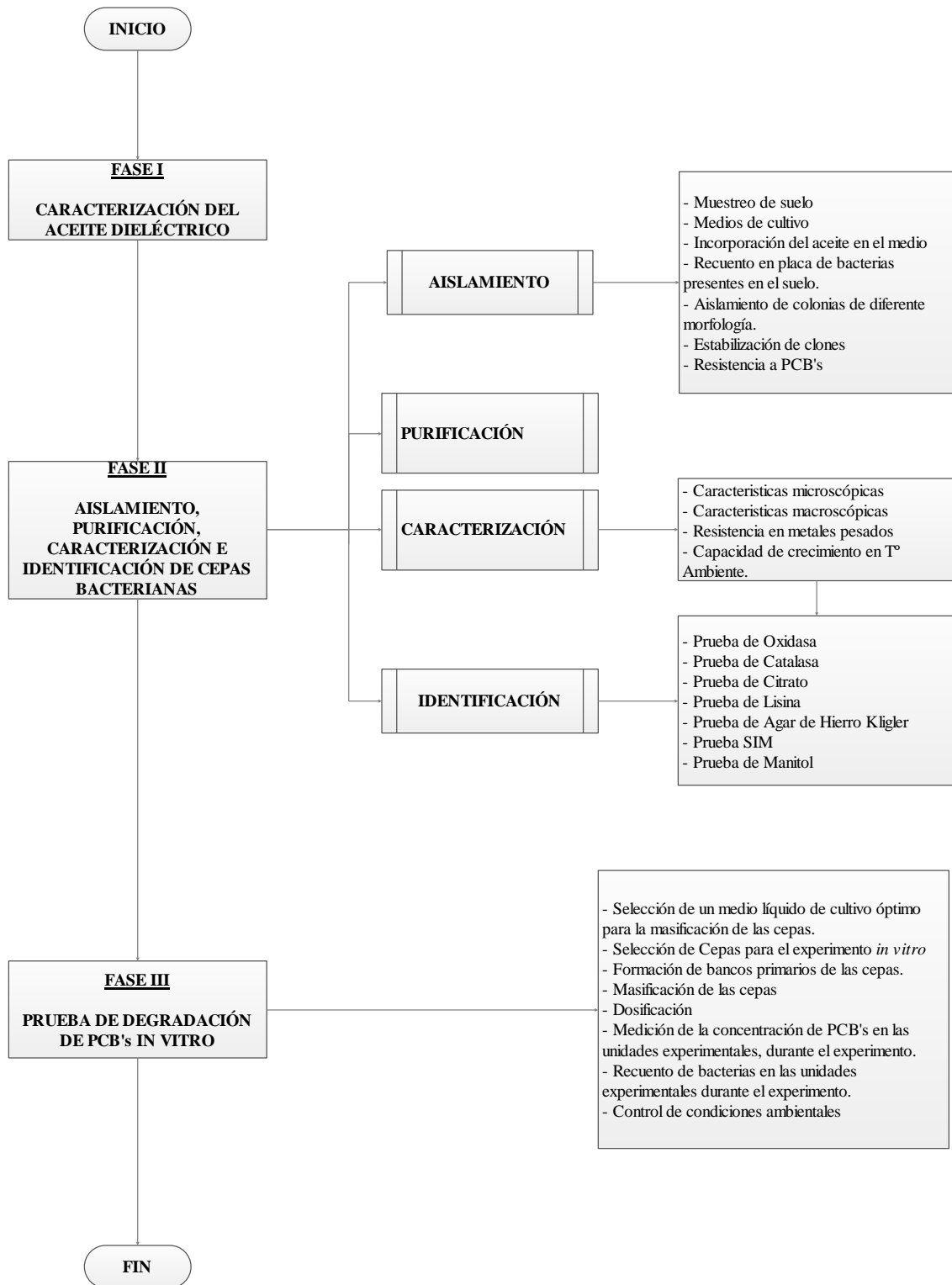


Ilustración 14. Diagrama de Flujo de la Investigación

Fuente: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2015

3.3.1.1. Procedimiento del muestreo del aceite dieléctrico

1. Se etiquetaron 4 botellas ámbar para el muestreo. (Dos para cada muestra)
2. Se colocó el equipo de protección personal antes de ingresar a la plataforma de transformadores de la Central Hidroeléctrica “Alao”, bajo la supervisión de un técnico de la EERSA, y el protocolo de seguridad correspondiente.
3. Se localizó el disyuntor de marca Westinghousen, con número de serie 1-37Y5416, de 72, 5 kV, el cual contenía aceite dieléctrico contaminado con PCB's según registros obtenidos de COADPLES (2009).
4. Con ayuda de un técnico, se abrió la válvula que permite descargar el aceite del transformador.
5. Se dejó gotear el aceite sobre un recipiente por 60 segundos.
6. Se tomó la muestra de aceite dieléctrico directamente en las botellas ámbar de 250 mL hasta llenarlas.
7. Se realizó el mismo proceso para tomar la segunda muestra de aceite. Este proveniente de un contenedor de aceite contaminado localizado en bodega de la Central Hidroeléctrica Alao.



Ilustración 15. Toma de aceite dieléctrico

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2015

La primera muestra de 250 mL de aceite dieléctrico fue enviada al Laboratorio CESTTA, para su posterior análisis. La determinación de Aroclor 1242, 1254, 1260 y PCB's totales, fue realizada utilizando cromatografía de gases aplicando la técnica PEE/LAB-CESTTA/232, Método de referencia: ASTM D4059-00-2010. Los 250 mL restantes fueron usados como medio de presión selectivo durante la investigación.

El aceite dieléctrico tomado para la segunda muestra ya se encontraba caracterizado según registros de aceites contaminados con PCB's con una concentración de 599 ppm; para comprobar este resultado se aplicó la prueba de Clor-N-Oil 500 y el resultado ratificó el antecedente.

Materiales

- Kit Clor-N-Oil 500
- Aceite dieléctrico
- Pipeta de plástico de 5mL

Procedimiento

1. El kit Clor-N-Oil 500, posee dos tubos de ensayo uno de tapa negra y otro de tapa blanca (buffer), se colocó con una pipeta de plástico 5 mL de aceite dieléctrico en el tubo con tapa negra.
2. Se rompió la ampolla que se encuentra en la parte inferior del tubo de tapa negra, se agitó el tubo durante 10 segundos, homogenizando la mezcla del aceite con el reactivo de la ampolla.
3. Se rompió la ampolla que se encuentra pegada a la tapa negra, se agitó el tubo durante 10 segundos, homogenizando la mezcla del aceite con el nuevo reactivo de la segunda ampolla rota.
4. Se dejó reposar por 50 segundos con el fin de que los reactivos actúen.
5. Se añadió el buffer contenido en el tubo de tapa blanca al tubo de tapa negra, se agitó por 10 segundos homogenizando el buffer con la mezcla anterior.
6. Se destapó el tubo de tapa negra para que se ventile el compuesto, se tapó y agitó nuevamente por 10 segundos.
7. Inmediatamente se volteó el tubo de ensayo para que el líquido pierda el color gris que adquiere.
8. Se observó inmediatamente la coloración que presenta el tubo de ensayo y se comparó con la cartilla del kit.

3.3.2. Fase II: Aislamiento, purificación, caracterización e identificación de cepas bacterianas

Esta fase se realizó siguiendo los pasos del método convencional para aislar bacterias del suelo. Y usando como medio de presión selectiva un determinado volumen de aceite dieléctrico contaminado con PCB's.

3.3.2.1. Aislamiento

A. Muestra de suelo: Para este ensayo microbiológico se tomó una muestra representativa de suelo de la Subestación de la Central Eléctrica “Alao”, siguiendo los pasos establecido a continuación:

Procedimiento

1. Se ingresó a la plataforma de la central hidroeléctrica Alao bajo la supervisión de un técnico de la ERSSA, y con el equipo de seguridad correspondiente.
2. Se procedió a tomar una muestra compuesta de seis sitios superficiales de suelo (hasta una profundidad aproximada de 50 cm) en los que se observó claramente manchas de derrame de aceite dieléctrico. Esto fue para asegurar la presencia de bacterias adaptadas a un ambiente saturado de aceite contaminado con PCB's.
3. Se tomó aproximadamente 1000 gramos de suelo.
4. Se colocó la muestra en una funda de papel, para mantener las condiciones de humedad y aireación de la muestra hasta llegar al lugar del desarrollo de la investigación (laboratorio).

B. Medios de cultivo: La siembra de microorganismos del suelo fue realizada en cuatro medios: Agar para métodos estándar (STD), Medio de Fósforo, Amonio y Sales (PAS), Medio Mínimo (Mm) y Mm + aceite dieléctrico contaminado con PCB's.

1º. Agar Métodos Estándar (STD): Es un medio rico en nutrientes y recomendado para recuperar la mayor cantidad de colonias bacterianas posibles del suelo o agua.

Tiene la siguiente composición:

Tabla 5. Composición de Agar para métodos estándar

Compuesto	Cantidad
Extracto de Levadura	2,5 g/L
Peptona de Caseína.	5,0 g/L
Dextrosa	1,0 g/L
Agar Bacteriológico	15,0 g/L
pH 7.0 ± 0.2	

Fuente: Acumedia, 2011, STANDARD METHODS AGAR 7157

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2015

2º. Medio de Fosfatos, amonio y sales (PAS):

El medio PAS, como tal es un medio líquido que fue usado en para aislar bacterias degradadoras de PCB's en una investigación realizar por Bopp, L en 1986 (incubadas a 30 °C). Para el presente estudio, se añadió Bacto Agar al 2% como agente solidificante con el objetivo de llevar el proceso en placas. Este medio cuenta con nutriente mínimos y fuente de carbono para el crecimiento bacteriano. En la Tabla 6, se detalla la composición del medio para un volumen de 1 Litro.

Tabla 6. Composición del Medio mínimo

(Fosfatos y amonio)PA (g/L)	K ₂ HPO ₄ , 56,8; KH ₂ PO ₄ , 22,0; NH ₄ Cl, 27,7
Sales (g/L)	MgSO ₄ , 19,5; MnSO ₄ *H ₂ O, 5,0; FeSO ₄ *7H ₂ O, 1,0; CaCl ₂ * 2H ₂ O, 0,3. Las sales deben ser acidificadas a un PH de 2,5 con HCl
Extracto de levadura	5% (p/v)

Fuente: Bopp, L. 1986. (Degradation of highly chlorinated PCBs by Pseudomonas strain LB400)

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2015

3°. Mm + aceite: Constituido por los mismos elementos del medio PAS (Tabla 6) sin la adición de extracto de levadura, el cual provee la fuente de carbono que la bacteria requiere para su sobrevivencia y desarrollo. Al suprimirse la levadura fue reemplazada por aceite dieléctrico contaminado, para garantizar que el carbono requerido por la bacteria sea consumido de este contaminante.

4°. Mm: Para la siembra, a más de los tres medios anteriormente descritos se utilizaron placas únicamente con Mm para comparar el crecimiento de estas placas con las placas de Mm + Aceite, y analizar el efecto del aceite dieléctrico contaminado de PCB's en el crecimiento bacteriano.

C. Incorporación del aceite en el medio: El aceite dieléctrico fue incorporado al medio de cultivo como un agente de presión selectiva. Para determinar la forma adecuada de hacerlo, se realizaron emulsiones colocando una alícuota de aceite en un tubo de ensayo con agua, posterior a ello se agito suavemente, sin embargo se observó que la emulsión no superaba los 10 segundos, lo que impedía su uso para incorporar el agente contaminante al medio de cultivo.

Para los ensayos fue necesario trabajar con aceite dieléctrico estéril. Pese a que por bibliografía se supo que los PCB's son altamente estables y muy difíciles de destruir a temperaturas relativamente bajas como el de autoclavado (121°C), se aplicó una prueba colorimétrica al aceite para detectar PCB's antes y después de su esterilización. En ambos casos el resultado fue positivo.



Ilustración 16. Prueba colorimétrica del aceite dieléctrico antes y después de su esterilización.

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2015

D. Recuento en placa de bacterias presentes en el suelo: Fue el inicio de recuperación de las bacterias del suelo de la Central Hidroeléctrica “Alao”. Se realizó mediante el procedimiento convencional para un cultivo de microorganismos del suelo, en los cuatro medios descritos arriba.

Materiales

- Agua destilada
- Peptona
- Medio de cultivo sólido Agar Standard Methods (STD)
- Medio de cultivo mínimo sólido (Mm)
- Medio de cultivo sólido PAS

- Medio de cultivo Mm + aceite contaminado con 43,6 ppm de PCB's
- Agar Bacto agar
- Aceite dieléctrico estéril

Procedimiento

1. Se preparó 120mL de agua de peptona, siguiendo las instrucciones de preparación: Disolver 15 g de Agua de peptona en 1000mL de agua destilada.
2. Se preparó 250 mL de Agar para métodos estándar, siguiendo las instrucciones de preparación: Disolver 23,5 g de Agar para métodos estándar en 1000mL de agua destilada.
3. Se preparó 250 mL de PAS con la composición descrita en la Tabla 6. y se solidificó con bacto agar al 2%.
4. Se preparó 250 mL de Mm (PAS sin extracto de levadura) y se solidificó con bacto agar al 2%.
5. Se extendió aceite dieléctrico en cada caja, del medio correspondiente.
6. Se preparó 250 mL de Mm y se solidificó con bacto agar al 2% (en estas cajas no se añadió aceite)
7. Se colocó 9mL de agua de peptona en cada tubo de ensayo etiquetado y fueron esterilizados a 121°C, por 15 minutos.
8. Se esterilizó aceite dieléctrico a 121°C, por 15 minutos.
9. Se disolvió 10 g de suelo en 90 mL de agua de peptona y se agito suavemente.

10. Se realizaron diluciones de -2,-3,-4 y -5, en los tubos de ensayo y se dejaron reposar por 15 minutos.
11. Se tomó 25µL de cada dilución y se sembró por extensión en las cajas Petri preparadas con los medios y etiquetados con cada dilución.
12. Se realizó una siembra por duplicado de cada dilución.
13. Se incubaron las placas por 24 horas a 30 °C.
14. Pasado este periodo, se realizó el recuento de colonias de cada placa para determinar la cantidad de microorganismos iniciales en el suelo.

Para reportar los resultados, se usó:

$$\frac{UFC}{g_{suelo}} = \frac{NC * \frac{1}{F} * \frac{1}{V}}{P} \quad (1)$$

Dónde,

UFC/g: Unidades Formadoras de Colonia por gramo de inóculo.

NC: Número de colonias por caja.

Se contaron las colonias mediante observación directa y si el NC >300, entonces:

$$NC = A * \bar{x}_n \quad (2)$$

A: Área de la caja Petri en cm²

\bar{X} : Para obtener este valor, se dividió la caja Petri en cuadros de 1cm x 1cm, se contaron las colonias de al menos cinco cuadros representativos y se obtuvo el promedio de microorganismos presentes.

n: Número de cuadros seleccionados. (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2013, <http://www.normalizacion.gob.ec/>).

F: Factor de dilución

V: Volumen de la alícuota

P: Peso del suelo en gramos (g)

E. **Aislamiento de colonias de diferente morfología:** El aislamiento se realizó en placas con tres medios: STD, PAS y Mm cada uno con aceite dieléctrico contaminado con PCB's, extendido en toda la superficie de la placa.

Materiales

- Cajas Petri con medios de PAS, Mm y STD
- Colonias diferenciadas.
- Aceite dieléctrico contaminado con PCB's.

Procedimiento

1. Se diferenciaron visualmente las colonias de las placas sembradas, según su tamaño, forma y color. Se enumeró cada colonia.
2. Se prepararon placas con medio STD, PAS y Mm.

3. Se extendió aceite dieléctrico en cada placa con los medios correspondientes, con el fin de convertir a las placas en medios selectivos, es decir las colonias que crezcan serán capaces de resistir y/o metabolizar el aceite.
4. Se dividió la cada placa en cuadrados de 1cm x 1cm y se etiquetó cada partición con números arábigos.
5. En la cámara de flujo y con ayuda de un asa, se tomó un inóculo de cada colonia diferenciada y se colocó en un cuadro con su número correspondiente. Este procedimiento se realizó en las tres placas con medios diferentes, el inóculo se picó primero en la placa de Mm, después en la placa de PAS (sin que el asa toque otra vez la colonia original) y por último en la placa de STD; el crecimiento de las colonias en la última placa (la más rica en nutrientes) sería la prueba de que se colocó inóculo en las dos placas anteriores.
6. Se incubaron las placas por 24 horas a 30 °C.
7. Se registró el crecimiento de las colonias por tres días.

Se realizó este procedimiento en tres etapas: a las 24, 96 y 168 horas de la siembra, según las colonias fueron apareciendo. Por lo tanto las placas correspondientes a la siembra de bacterias de suelo que no presentaban un buen crecimiento bacteriano en las primeras 24 horas, fueron llevadas de vuelta a incubación por 30 °C y observadas por los siguientes 7 días.

Las colonias aisladas a las 24 horas de crecimiento fueron mantenidas en refrigeración a partir de las 72 horas de crecimiento para evitar la invasión de cada colonia respecto a otra, hasta aislar las colonias de todas las placas sembradas. El crecimiento de las colonias aisladas a las 72 horas fue reportado por 5 días, y el crecimiento de las colonias aisladas a las 168 horas a partir de la siembra fue reportado por tres días.

F. Estabilización de las colonias: Muchas veces las bacterias sobreviven a la siembra en placa gracias a la reserva de nutrientes que llevan consigo y no siempre debido a los nutrientes que un determinado medio les proporciona, por ende, fue necesario asegurar su posterior crecimiento repicándolas en un medio rico de nutrientes (STD) para recuperar su crecimiento y después repicarlas en los tres distintos medios hasta estabilizar su crecimiento y con esto garantizar su posterior uso durante los ensayos restantes.

Materiales

- Colonias aisladas
- Cajas Petri con medio PAS, Mm y STD.
- Aceite dieléctrico contaminado con PCB's

Procedimiento

1. Se prepararon 2 cajas con medio STD y una placa con medio PAS y Mm.
2. Se extendió aceite dieléctrico contaminado con PCB's en todas las placas.
3. Se dividieron las cajas Petri en cuadrados de 1cm x 1cm y se etiquetaron las particiones con números arábigos.
4. En la cámara de flujo, se procedió a tomar una pequeña muestra de la colonia y sembrarla en la cuadrícula correspondiente. (Primero en el medio STD, después en el medio PAS y por último en el medio Mm)
5. Se incubó por 24 horas a 30°C
6. Se reportó el crecimiento de las colonias, a las 24 horas.

7. Las colonias bacterianas se repicaron tres hasta observar un crecimiento uniforme y constante.
8. Para asegurar el crecimiento de todas las colonias aisladas en el paso anterior, el repique N°1 se realizó únicamente en medio STD.

G. Resistencia a PCB's: Una vez adaptadas y estabilizadas las bacterias fue necesario probar su capacidad de crecimiento frente a una mayor concentración y volumen del aceite dieléctrico contaminado con PCB's, para elegir aquellas colonias que mejor comportamiento mostraban y presentaban potencial para el experimento final. Se valoró la resistencia de las colonias al contaminante en dos casos.

Materiales

- Colonias bacterianas estabilizados
- Cajas Petri con medio PAS, Mm y Agar métodos estándar
- Aceite dieléctrico con una concentración de 43,6 ppm de PCB's
- Aceite dieléctrico con concentración de 599 ppm de PCB's

Procedimiento

1. Se sometieron las colonias a 43,6 ppm de PCB's dosificado en cada placa. Se incubaron a una temperatura de 30°C y se observó su crecimiento a las 24 horas.

2. Se sometieron las colonias a 599 ppm de PCB's dosificado en volúmenes adecuados a una temperatura de 30°C y se observó su crecimiento a las 24 horas.
3. Todos los resultados fueron reportados.

3.3.2.2. Purificación

Se usó la técnica de estriado para purificar cada una de las colonias que se hasta ese momento se habían adaptado adecuadamente y superado los ensayos a los que se las sometieron. Este paso fue importante para la correcta caracterización de las colonias tanto macroscópica como microscópica y su identificación mediante pruebas bioquímicas.

La purificación de las colonias se realizó únicamente en medio STD y sin aceite para facilitar el proceso.

Materiales

- Cajas Petri con medio STD.
- Colonias bacterianas resistentes a la presencia de PCB's.

Procedimiento

1. Se dividió las cajas Petri en dos cuadrantes.
2. Se etiquetó cada cuadrante con los números correspondientes a las colonias bacterianas resistentes a PCB's.

3. En la cámara de flujo, con ayuda de un asa estéril se procedió a tomar una muestra de cada colonia y se sembró en uno de los cuadrantes de la placa mediante la técnica de estriado. Ilustración 17.
4. Se incubaron las placas por 24 horas y a 30°C.
5. Al siguiente día, en la cámara de flujo se tomó una colonia aislada de cada cuadrante y se la colocó respectivamente en una placa con medio STD, dividida en cuadros de 1x1cm y enumerados de acuerdo a las colonias.

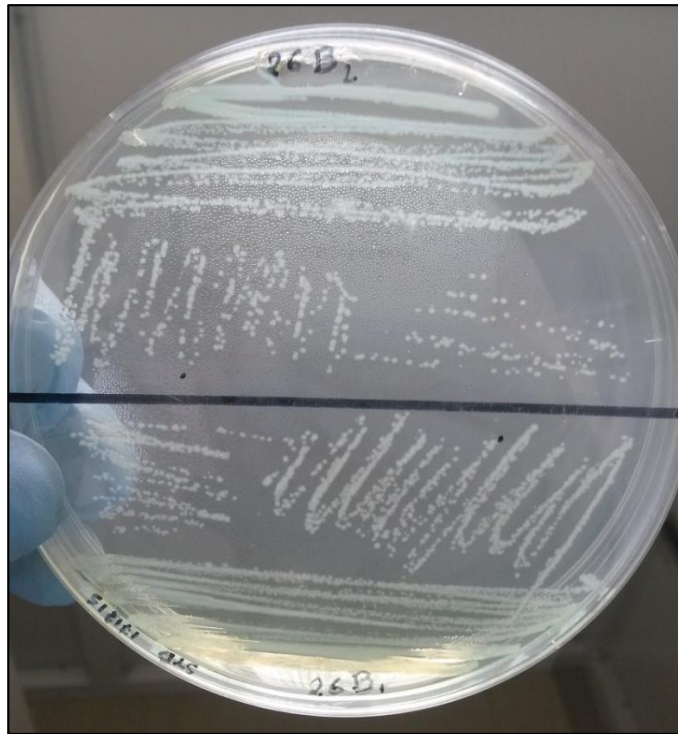


Ilustración 17. Purificación por estriado de las colonias aisladas.
Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2015

3.3.2.3. *Caracterización de las cepas puros*

A. Características macroscópicas de las cepas

La evaluación de la caracterización macroscópica de las cepas se llevó a cabo mediante la observación visual del crecimiento de las cepas en una placa de agar STD, debido a que la forma y aspecto de las colonias suelen ser constantes para cada género o especie, ayudando a su posterior identificación. Para este proceso se consideraron parámetros como forma, elevación, margen, coloración y pigmentación del medio.

Materiales

- Cepas de las bacterianas purificadas.

Procedimiento

1. Con ayuda de una imagen de referencia se caracterizó macroscópicamente las colonias, respondiendo a los parámetros de: forma, elevación, margen y coloración.

B. Tinción Gram de las cepas (Caracterización microscópica)

Materiales

- Cepas bacterianas purificadas
- Microscopio

Reactivos

- Suero Fisiológico

- Cristal violeta
- Lugol
- Alcohol cetona
- Safranina
- Aceite de inmersión.
- Agua

Procedimiento

1. Se colocó una gota de suero fisiológico en un porta objetos.
2. Con el asa estéril se tomó una pequeña muestra de una cepa purificada.
3. Se colocó la muestra sobre la gota de suero fisiológico.
4. Se procedió a frotar la muestra hasta mezclarla homogéneamente con la gota de suero.
5. Se dejó secar a temperatura ambiente.
6. Se fijó la muestra con calor, flameándolo sobre el mechero aproximadamente tres veces.
7. Se procedió a realizar la tinción de la muestra siguiendo los pasos:
 - Coloración con cristal violeta durante un minuto.
 - Lavado inmediato con agua (no directamente sobre la muestra)

- Teñido con lugol durante un minuto.
- Lavado con agua inmediatamente.
- Decoloración con alcohol cetona por 30 segundos.
- Lavado con agua inmediatamente.
- Teñido con safranina durante un minuto.
- Lavado con agua inmediatamente.
- Eliminación del agua de la muestra.
- Se colocó una gota de aceite de inmersión en la muestra.
- Se Observa la placa con un lente de 100x.

C. **Resistencia de las cepas a metales pesados**

Una de las formas de caracterizar un cepa bacteriana es probando su resistencia a la presencia de metales pesados. Además esta característica aportó con un criterio más en la elección de las cepas para el experimento final, pues se prefirieron aquellas cepas capaces de resistir a cualquier otro medio hostil y aun así mostrar crecimiento.

Materiales

- Cepas de bacterias purificadas.
- Cajas Petri bifásicas de 90 x 15 mm

Reactivos

- Agar para métodos estándar
- Medio PAS agarizado

- Arsenito de Sodio NaAsO_2
- Nitrato de Cadmio $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- Nitrato Mercúrico $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- Nitrato Cúprico $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- Acetato de Plomo PbCH_3COO

Procedimiento

1. Se preparó 100 mL de Medio PAS agarizado, repartidos en 5 matraces.
2. Una vez esterilizados los matraces con el medio PAS se añadieron las sales de cada metal para formar soluciones con las siguientes concentraciones:
 - As: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de medio PAS
 - Cd: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de medio PAS
 - Cu: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de medio PAS
 - Hg: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de medio PAS
 - Pb: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de medio PAS
3. Se preparó 100 mL de medio STD.
4. Se dividieron ambos compartimientos de la caja Petri en 20 cuadrados de 1cm x 1cm y se los etiquetó con los números arábigos correspondientes al número de cada cepa.
5. En el primer compartimiento de la placa bifásica se colocó el medio PAS en solución con el metal correspondiente y en el segundo compartimiento se colocó únicamente medio STD.

6. En la cámara de flujo y con ayuda de un asa, se tomó un inóculo de cada colonia purificada y se colocó en el cuadro correspondiente del primer compartimiento.
7. Sin volver el asa a la colonia original se picó en el cuadro correspondiente del segundo compartimiento. El crecimiento en el segundo compartimiento ratificaría que la cepa si fue inoculado en el primer compartimiento.
8. Se incubaron las placas por 24 horas a 30 °C.

D. Capacidad de crecimiento a temperatura ambiente (con 150 mL de aceite contaminado con 599 ppm de PCB's)

Si en estudios posteriores se desea desarrollar una práctica de biorremediación con los microorganismos nativos aislados y purificados, es necesario someterlos a condiciones semejantes a su medio natural; es importante que sean capaces de crecer y asimilar un contaminante después de ser aislados y mantenidos en condiciones de laboratorio. Es por ello que se realizó un breve ensayo para evaluar su capacidad de crecimiento a una temperatura ambiente promedio de la ciudad de Riobamba (17 °C). Este ensayo se llevó a cabo en placas con medio PAS para darle una característica más natural al medio de crecimiento.

Materiales

- Cepas puras de bacterias
- Placas con medio PAS
- Aceite dieléctrico contaminado

Procedimiento

1. Se dividió la caja Petri en cuadrantes de 1x1 cm enumerados según en los números correspondientes a las cepas purificados.
9. En la cámara de flujo, con ayuda de un asa estéril se procedió a tomar una muestra de cada colonia y se sembró en los cuadrantes correspondientes de la placa.
10. Se dejaron las placas a temperatura ambiente aproximadamente por 48 horas hasta observar un crecimiento significativo de las colonias.

3.3.2.4. Identificación de la especie de las cepas

Para este proceso fueron necesarias 4 placas con cepas purificadas y así contar con una cantidad suficiente de masa bacteriana para llevar a cabo todos los ensayos para la identificación.

El fundamento de cada ensayo está detallado en el Capítulo I de esta investigación. A continuación se detalla el procedimiento con el que se determinó la especie de cada cepa mediante las siguientes pruebas bioquímicas:

a. Prueba de oxidasa

Materiales

- Cepas puras

- Tiras de papel impregnadas con reactivo de Kovacs.

Procedimiento

1. Con un palillo de madera estéril, se tomó una muestra de la bacteria.
2. Se puso en contacto la muestra con la tira de papel.
3. Se observó el cambio o no de coloración (a morado) en un lapso no mayor a 30 segundos.

b. Prueba de catalasa

Materiales

- Cepas puras
- Agua oxigenada al 30%.

Procedimiento

1. Se colocó un pequeño inóculo sobre una placa portaobjetos.
2. Se añadió una gota de agua oxigenada.
3. Se observó el desprendimiento o ausencia de gas inmediatamente.

c. Prueba del uso de citrato como única fuente de carbono y energía

Materiales

- Agar Citrato de Simmons
- Colonias puras
- Tubos de ensayo de 5mL

Procedimiento

1. Se disolvió 1,8 g de Agar Citrato de Simmons en 80mL de agua destilada, se llevó a ebullición y se esterilizó.
2. Se colocó 5 mL del medio en un tubo de 5mL, y se lo dejó enfriar con una inclinación de 15° para formar pico de flauta.
3. Se inóculo en estría, en el pico de flauta, empezando desde el fondo hasta la parte más alta.
4. Se incubó a 35°C durante 24 horas.

d. Prueba de Ureasa

Materiales

- Medio Christensen

- Colonias puras
- Tubos de ensayo de 5mL

Procedimiento

1. Se disolvió 1,68 g de Medio Christensen en 80mL de agua destilada, se llevó a ebullición y se esterilizó en el autoclave.
2. Se colocó 5 mL del medio en cada tubo, y se lo dejó enfriar con una inclinación de 5° para formar pico de flauta.
3. Se realizó un inóculo estriado en el pico de flauta.
4. Se incubó a 35°C durante 24 horas.

e. Fermentación de glucosa, lactosa y producción de H₂S

Materiales

- Agar de Hierro Kligler
- Colonias puras
- Tubos de ensayo de 5mL

Procedimiento

1. Se disolvió 4,40 g de Agar de Hierro Kligler en 80mL de agua destilada, se llevó a ebullición y se esterilizó en el autoclave.
2. Se colocó 5 mL del medio en cada tubo, y se lo dejó enfriar con una inclinación de 15° para formar pico de flauta.
3. Con una aguja de inoculación se tomó una colonia aislada y se sembró por estriado desde el fondo del pico de flauta.
4. Se incubó a 35°C durante 24 horas.

f. Prueba de la descarboxilación/ desaminación de la Lisina

Materiales

- Lisina Hierro Agar
- Colonias puras
- Tubos de ensayo de 5mL

Procedimiento

1. Se disolvió 2,76 g de medio Lisina Hierro Agar en 80mL de agua destilada, se llevó a ebullición y se esterilizó en el autoclave.
2. Se colocó 5 mL del medio en cada tubo, y se lo dejó enfriar verticalmente.
3. Se sembró por punción profunda en el tubo.

4. Se incubó a 35°C durante 24 horas.

g. Prueba de movilidad, producción de indol y H₂S (SIM medio)

Materiales

- SIM Medio
- Cepas puras
- Tubos de ensayo de 5mL

Procedimiento

1. Se disolvió 2,40 g de Medio SIM en 80mL de agua destilada, se llevó a ebullición y se esterilizó en el autoclave.
2. Se colocó 5 mL del medio en cada tubo, y se lo dejó enfriar verticalmente.
3. Se sembró por punción profunda en el tubo.
4. Se incubó a 35°C durante 24 horas.

Para determinar la presencia triptófano en la prueba de indol, pasado este periodo se añadió 5 gotas de reactivo Kovacs y se observó la aparición o no de un anillo.

h. Prueba de la fermentación del Manitol - Movilidad

Material

- Manitol Agar
- Colonias puras
- Cajas Petri bifásicas de 90 x 15 mm

Procedimiento

1. Se disolvió 22,2 g de Agar Manitol en 200mL de agua destilada, se llevó a ebullición y se esterilizó en el autoclave.
2. Se colocó 20 mL del medio en cada placa.
3. Se sembró por estría.
4. Se incubó a 35°C durante 24 horas.

Con los resultados obtenidos de todas las pruebas y comparándolas con la bibliografía, se pudieron interpretar el género y especie a la que pertenecía cada cepa aislada y purificado.

3.3.3. Fase III: Evaluación de la degradación de PCB's mediante una prueba in vitro

3.3.3.1. Selección de un medio de cultivo óptimo para la masificación de las cepas

Según Boop (1986), el medio PAS es suficiente para el crecimiento de bacterias con potencialidad para degradar PCB's, sin embargo, para dosificar las bacterias en el medio experimental (arena) fue necesario inducir las a un crecimiento exponencial por lo que fue necesario probar otros medios líquidos más ricos para alcanzaban una mayor densidad bacteriana.

Materiales

- Agua de peptona
- Caldo Tripticasa de soya
- Medio PAS líquido
- Cepas identificadas

Procedimiento

1. Se prepararon 200 mL de cada medio líquido.
2. Se añadió 9 mL de cada medio líquido en los tubos de ensayo.

3. Una vez que medios estuvieron estériles y fríos, en la cámara de flujo, se procedió a colocar un inóculo de cada en cepa en los tubos correspondientes.
4. Se inocularon todas las cepas en los tres medios líquidos.
5. Se incubaron por 24 horas a 30 °C.
6. Al día siguiente, se observó la turbiedad en los tubos con los medios.
7. Se seleccionó el medio óptimo para crecimiento de las bacterias.

3.3.3.2. Selección de cepas para el experimento *in vitro*

De las cepas que resistieron hasta este punto del proceso se seleccionaron tres para el experimento mediante los siguientes criterios:

- Aquellas que no son patógenas
- Aquellas que se adaptaron y estabilizaron sin presentar dificultad.
- Aquellas de mayor tamaño.
- Aquellas con el menor tiempo de crecimiento.
- Aquellas que logran crecer a temperatura ambiente.
- Aquellas que requieren de mínimas cantidades de nutrientes para crecer (Mm)
- Aquellas capaces de crecer frente a un mayor volumen del aceite dieléctrico y concentración de PCB's.

- Aquellas resistentes a metales pesados.
- Aquellas que presentan mejor crecimiento (mayor turbiedad) en el medio líquido seleccionado.

3.3.3.3. *Formación de bancos primarios de las cepas*

Una vez seleccionados las tres cepas para someterlas al experimental, fue necesario generar un banco de cada uno para poderlos conservar en congelación y disponer de ellos para cualquier requerimiento del experimento.

Materiales

- Tubos Eppendorf
- Agua de Peptona
- Glicerol
- Freezer

Procedimiento

1. Se preparó 60 mL de agua de peptona y se esterilizó.
2. Se etiquetó cada matraz con el número de cepa correspondiente.

3. En la cámara de flujo se colocó 17 mL de agua de peptona en cada matraz.
4. Con el asa estéril se tomó una muestra considerable de cada colonia y se colocó en el matraz correspondiente.
5. Se agitó cada matraz hasta mezclar homogéneamente las bacterias con el medio líquido.
6. Se incubaron por 24 horas a 30 ° C para acelerar el crecimiento bacteriano en el medio líquido.
7. Tras las 24 horas, se añadió 3 mL de glicerol en cada matraz.
8. Se tomó 1mL de dicha suspensión y se colocó en tubos Eppendorf.
9. Los tubos Eppendorf se conservaron en un freezer a una temperatura de -4°C. (Piñales, *et al.*, 1994, p. 57)

3.3.3.4. Masificación de las cepas

En este proceso se utilizó el medio líquido óptimo elegido mediante los resultados del ensayo aplicado previamente y una placa con las tres cepas que mejor respondieron a los criterios de selección. Cabe indicar que las cepas además de ser conservados en congelación a 4°C, fueron constantemente repicadas en placas de medio STD para hacer uso de ellos en los ensayos restantes.

Materiales

- Placa con las cepas puros seleccionados.

- Agua de peptona.
- Centrifuga.

Procedimiento

1. Se preparó 150 mL de agua de peptona estéril.
2. Se repartió 50 mL de agua peptona en tres matraces Erlenmeyer etiquetados con el número de cepa correspondiente.
3. En la cámara de flujo, se tomó una alícuota de cada colonia para ser añadida a cada matraz. Se agitó la solución.
4. Se incubó la siembra por 24 horas a 30 °C
5. Una vez masificadas las bacterias, asépticamente en la cámara de flujo se repartió 9 mL de la suspensión de cada matraz en 5 tubos de ensayo previamente etiquetados con los números de las cepas.
6. Se centrifugó la suspensión hasta que la biomasa decante.
7. Se preparó 90 mL de agua de peptona estéril, repartida en 3 matraces de 50 mL.
8. En la cámara de flujo de manera aséptica se procedió a realizar un lavado de los tubos que contenían la biomasa decantada con el agua de peptona preparada previamente.
9. Este lavado se recolectó en matraces estériles y etiquetados para cada cepa.

3.3.3.5. Densidad celular obtenida tras la masificación de las cepas.

Para conocer la concentración celular con la que inició el experimento se midió la absorbancia del medio de cultivo con cada cepa masificada antes de ser sometidos a centrifugación. Con base en la longitud de onda y los valores de absorbancias obtenidos se intercalo en la tabla de Mc Farland. Anexo C.

3.3.3.6. Dosificación

Se utilizó como matriz de soporte arena de río, debido a su naturaleza químicamente inerte y estable. Previo a la dosificación se realizó una prueba con la arena, para determinar la capacidad de adhesión del aceite dieléctrico en este medio.

Materiales

- Cajas Petri de vidrio
- Arena de rio estéril
- Varilla de Agitación
- Aceite dieléctrico esterilizado contaminado con PCB's.
- Inóculo de cepas bacterianas masificadas

Procedimiento

1. Se etiquetaron las cajas Petri de vidrio de la siguiente manera:

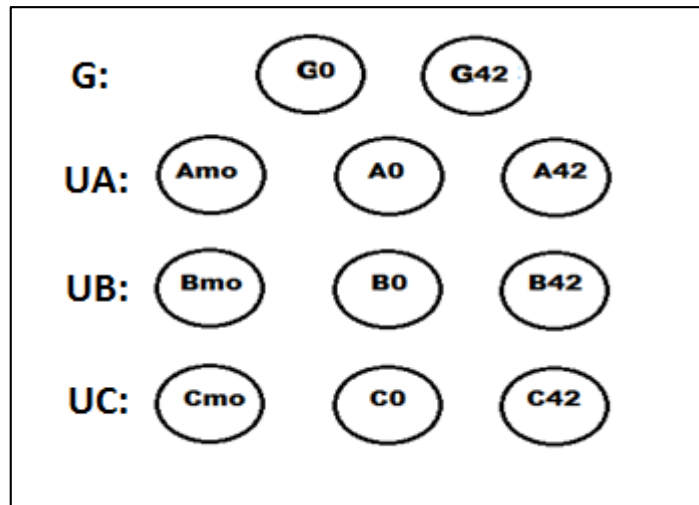


Ilustración 18. Experimentos a realizarse

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2015

Donde,

G: Grupo control de la concentración de PCB's sin la acción de las bacterias.

G0: Control de la concentración de PCB's sin la acción de las bacterias al tiempo 0 (Arena + Aceite)

G42: Control de la concentración de PCB's sin la acción de las bacterias a los 42 días (Arena + Aceite)

UA: Unidad experimental A, acción de la cepa N° 100 sobre la concentración de los PCB's en una matriz de arena.

UB: Unidad experimental B, acción de la cepa N° 105 sobre la concentración de los PCB's en una matriz de arena.

UC: Unidad experimental C: acción de la cepa N° 26 sobre la concentración de los PCB's en una matriz de arena.

Amo: Control del crecimiento bacteriano sin la presencia de aceite contaminado con PCB's.

UA0: Medición de PCB's al tiempo 0 en UA (Cepa N° 100 + arena + Aceite contaminado con PCB's)

UA42: Medición PCB's a los 42 días en UA (Cepa N° 100 + arena + Aceite contaminado con PCB's)

Bmo: Control del crecimiento bacteriano sin la presencia de aceite contaminado con PCB's.

UB0: Medición de PCB's al tiempo 0 en UB (Cepa N° 105 + arena + Aceite contaminado con PCB's)

UB42: Medición de PCB's a los 42 días en UB (Cepa N° 105 + arena + Aceite contaminado con PCB's)

Cmo: Control del crecimiento bacteriano sin la presencia de aceite contaminado con PCB's.

UC0: Medición de PCB's al tiempo 0 en UC (Cepa N° 26 + arena + Aceite contaminado con PCB's)

UC42: Medición de PCB's a los 42 días en UC (Cepa N° 26 + arena + Aceite contaminado con PCB's)

2. Se colocó 50g de arena y aceite dieléctrico contaminado con PCB's en 8 cajas Petri de vidrio.
3. Se homogenizó la mezcla con una varilla de agitación.
4. Se colocó 50g de arena en 3 cajas Petri de vidrio.
5. Se esterilizaron todas las cajas Petri a 121 °C por 15 minutos.

6. En la cámara de flujo se incorporó el inóculo de cada cepa en la caja Petri correspondiente según la etiqueta, excepto a G0 y G42.
7. Se homogenizó la mezcla de cada caja Petri con una varilla de agitación estéril.
8. Se incubaron a 30 °C en los periodos establecidos.

3.3.3.7. Mediciones de PCB's

Para este experimento se usó una muestra de aceite dieléctrico contaminado con una concentración conocida de PCB's, analizada en el LAB-CESTTA mediante la técnica: PEE/LAB-CESTTA/232 (Anexo D)

Tras la dosificación del inóculo en las cajas con la arena, se realizó la medición de la concentración de PCB's de las cajas G0, A0, B0, C0 y posterior a los 42 días correspondientes, se determinó la concentración de PCB's en las Cajas G42, A42, B42 y C42. Los análisis fueron realizados en el LAB-CESTTA, con su técnica correspondiente: PEE/LAB-CESTTA/232.

3.3.3.8. Recuento de microorganismos en el experimento

Para observar el crecimiento de las bacterias durante el periodo del experimento se realizó un recuento de colonias bacterianas a los 18 y 42 días de iniciar el tratamiento. Esta medida se aplicó a las siguientes unidades experimentales: Amo, UA, Bmo, UB, Cmo, UC; para UA, UB y UC se realizaron recuentos por duplicado.

Materiales

- Agar para métodos estándar
- Peptona

Procedimiento

1. Se preparó 100 mL de peptona y se colocó 9mL en cada tubo de ensayo para su posterior esterilización.
2. Se tomó 1 g de arena de cada caja Petri y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 9mL de agua de peptona.
3. Se preparó 400mL de Agar para métodos estándar y se distribuyó en cajas Petri etiquetadas.
4. Se inoculó 100 μ L de la solución en las cajas correspondientes.
5. La siembra de las matrices UA, UB y UC se realizó por duplicado.
6. Se incubó por 24 horas y a 30°C.
7. Se contaron el número de colonias existentes en cada caja.
8. Este procedimiento se llevó acabo a los 18 y 42 días de haber dosificado el inóculo en la arena.

Se determinó el número de colonias directamente de aquellas que placas que fueron contables y de aquellas que no mediante método utilizado anteriormente según las normas NTE INEN 12:05

3.3.3.9. Control de condiciones ambientales

La temperatura de trabajo fue de 30 °C, como lo recomienda Rodríguez (2005) y se controló con una incubadora, manteniéndola durante la investigación.

El pH del medio debió ser mantenida de a 5-6, adecuado para el crecimiento microbiano bajo la presencia de PCB's. (Boop, 1986)

La humedad del medio experimental de arena debió ser controlada en la incubadora. Una temperatura de 30°C proporciona una fuente adecuada de agua para mantener condiciones óptimas de humedad, del 40 al 60%, en el medio para el crecimiento bacteriano (Boop, 1986). Además, para mantener la humedad ambiental se colocaron frascos de agua en el interior de la incubadora.

A. Medición de pH: Con la finalidad de medir y controlar las condiciones de pH, se realizó un control de éste parámetro.

Materiales

- Frascos estériles
- Phmetro
- Agua destilada

Procedimiento

1. Se disolvió 10 g de arena en 40mL de agua destilada.
2. Se realizaron las lecturas en un pHmetro previamente calibrado.

B. Control de la temperatura: La temperatura del experimento fue controlada gracias al uso de una incubadora, la cual permitió mantenerla a 30 °C, el sistema.

C. Medición del porcentaje de humedad (%h): Para mantener la humedad (40 al 60 %) de las placas se colocaron recipientes con agua dentro de la incubadora donde se encontraba las placas experimentales. Para su medición se siguió:

Materiales

- 5g de muestra de la arena (de cada caja del experimento)
- Balanza analítica
- Capsulas de cerámica
- Estufa a 200 °C

Procedimiento

1. Se pesaron las capsulas: P1
2. Se pesaron las capsulas con la muestra húmeda: P2

3. Se colocaron las capsulas con la muestra húmeda en la estufa a 105°C por 24 horas.
4. Al día siguiente se pesaron las capsulas con el material seco: P3

D. Cálculo del porcentaje de humedad (%h)

$$ph = p2 - p1 \text{ (Peso húmedo)}$$

$$ps = p3 - p1 \text{ (Peso seco)}$$

$$\%h = \frac{ph-ps}{ph} \times 100$$

Esta medición se realizó a los días 0, 18 y 42 del experimento en los experimentos: Amo, Bmo, Cmo, UA, UB y UC.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Fase I: Caracterización del aceite dieléctrico

Las muestras de aceite obtenidas para la caracterización fueron recolectadas de la Central Hidroeléctrica “Alao” de la EERSA, ubicada en la Parroquia Rural Licto del cantón Riobamba. Obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 7. Resultados de la concentración de PCB's en muestra de aceite.

PARÁMETROS	MÉTODO/NORMA	RESULTADOS	UNIDAD
Aroclor 1242	Cromatografía de gases	<10	mg/kg
Aroclor 1254	Cromatografía de gases	<10	mg/kg
Aroclor 1260	Cromatografía de gases	43,6	mg/kg
PCB's total	Cromatografía de gases	43,6	mg/kg

Fuente: Lab CESTTA, 2015 (Informe de ensayo N° 1068)

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

Se aplicó la prueba colorimétrica a una segunda muestra de aceite, obtenido de uno de los disyuntores de la Central Hidroeléctrica “Alao”, se obtuvo una coloración amarilla lo que permitió interpretar la presencia de PCB's en un rango de 50 a 500ppm con base a la carta de comparación (Ilustración 19). Este resultado fue respaldado con los resultados de un análisis cuantitativo anterior realizado en su momento por la EERSA.



Ilustración 19. Resultado del ensayo realizado con el kit colorimétrico
Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

4.2. Fase II: Aislamiento, purificación, caracterización e identificación de cepas bacterianas

4.2.1. Aislamiento de colonias bacterianas

Se usaron cuatro medios de cultivos distintos para evaluar desde un principio el comportamiento de las bacterias nativas del suelo: STD, PAS, Mm, Mm+ aceite. En la Tabla 8 se detalla el recuento de microorganismos del suelo. En el Anexo E se encuentran los cálculos correspondientes para aquellas cajas en las que fue necesario aplicar el método recomendado por la NTE INEN 12:05

4.2.1.1. Recuento en placa de bacterias presentes en el suelo

Tabla 8. Recuento en placa de microorganismo del suelo.

Medio	Serie Duplicada	Diluciones				Resultado UFC/g	Promedio Resultados
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		
STD	A	> 100 colonia s/cm ²	> 100 colonia s/cm ²	52	5	1,30 x10 ¹¹	1,2x10 ¹¹
	B	> 100 colonia s/cm ²	> 100 colonia s/cm ²	43	4	1,04 x10 ¹¹	
PAS	A	3718	304	9	4	1,21x10 ⁷	1,2x10 ⁷
	B	3952	298	8	3	1,19 x10 ⁷	
Mm	A	1560	130	15	1	5,20x10 ⁶	5,0 x10 ⁶
	B	1638	118	13	1	4,72x10 ⁶	
Mm + Aceite	A	2119	247	22	2	9,88x10 ⁶	9,6 x10 ⁶
	B	2093	234	19	1	9,36x10 ⁶	

*Las celdas en gris corresponden a las diluciones representativas para determinar la cantidad inicial de microorganismo en el suelo según la NTE INEN 12:05

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

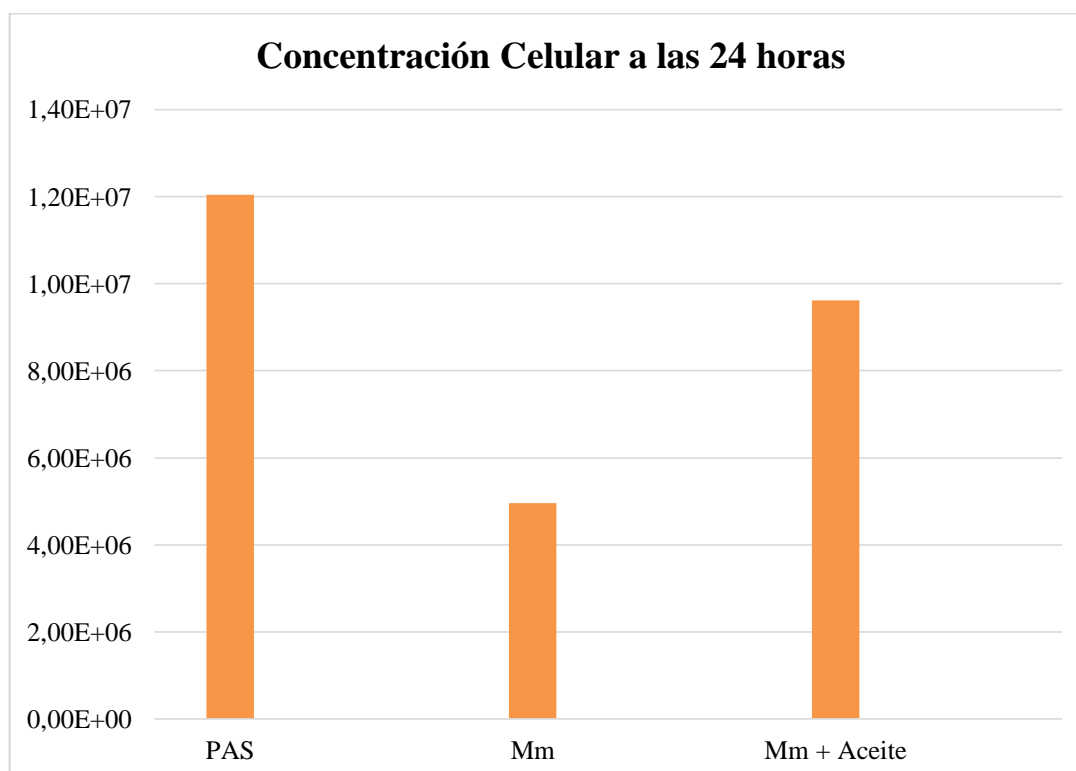


Ilustración 20. Crecimiento bacteriano a 30°C en 24 horas en los distintos medios.

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

Al cabo de 24 horas se realizó el recuento bacteriano en placas. Como se esperaba, el crecimiento en el medio STD superó por mucho al crecimiento bacteriano de los tres medios restantes (Tabla 8)

Como indica la Ilustración 20, en todas las placas hubo crecimiento de bacterias, determinando así que las colonias obtenidas pueden desarrollarse en un medio mínimo. Sin embargo, en la placa de medio Mm + aceite se observa mayor crecimiento (casi el doble) que en la placa de Mm, lo que demuestra que existen bacterias a las que el aceite dieléctrico contaminado con PCB's le confiere una ventaja de crecimiento y pueden estar usándolo como fuente de carbono.

El crecimiento de las bacterias en las placas del medio PAS se asemeja a las placas con Mm + aceite contaminado con PCB's, la explicación más probable para este resultado es que entre ambos medios lo único que difiere es la fuente de carbono. El medio PAS contiene extracto de levadura que funciona como una fuente de carbono y energía alternativa para el crecimiento bacteriano (Medios de cultivo, 2012, <http://www.ms.gba.gov.ar/sitios/laboratorio>). La fuente de carbono del Mm + aceite, es en cambio el aceite contaminado con PCB's, más difícil de digerir por las bacterias que el extracto de levadura. Por ende, la ligera variación en el crecimiento, a favor del medio PAS, es explica por esta razón.

El menor crecimiento bacteriano observado en las placas que contenían únicamente Mm pudo ser provocado por la baja concentración de nutrientes o por el requerimiento de un tiempo mayor de incubación. Para descartar esta última posibilidad, posterior al recuento, se dejaron las placas en incubación a 30° C por 7 días más.

4.2.1.2. Aislamiento de colonias de diferente morfología

Se aislaron colonias bacterianas en tres etapas de acuerdo al tiempo en que las colonias iban apareciendo tras la siembra en los diferentes medios y al menos un representante de cada uno de los grupos bacterianos obtenidos.

- ***Bacterias aisladas a las 24 horas de la siembra***

Transcurridas las 24 horas desde la siembra, se obtuvieron 29 colonias. Se aislaron todas aquellas colonias diferentes por su forma, color, aspecto, elevación y bordes. En la Tabla 9 se puede verificar su crecimiento durante los siguientes 3 días, cada una fue repicada en 3 placas con medios distintos: STD, PAS y Mm, bajo la presión selectiva del aceite.

Este criterio permitió en posterior escoger las colonias que fueron capaces de hacer frente a concentraciones mínimas de nutrientes.

Tabla 9. Primer aislamiento de colonias a las 24 horas de siembra.

Fecha de siembra:		14/10/2015								
Fecha de aislamiento:		15/10/2015								
N° Colonia	16/10/2015			19/10/2015			20/10/2015			
	PAS	Mm	St	PAS	Mm	St	PAS	Mm	St	
1	-	-	+	-	-	+	-	-	+	
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13	+	-	+	+	-	+	+	-	+	
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
20	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
21	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
23	-	+	+	-	+	+	-	+	+	
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
27	-	+	-	-	+	+	-	+	-	
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
29	-	-	+	-	-	+	-	-	+	

Las filas marcadas en verde, corresponden a las colonias de bacterias con un crecimiento significativo.

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

- *Bacterias aisladas a las 96 horas de la siembra*

Tabla 10. Segundo aislamiento de colonias bacterianas a las 96 horas de la siembra.

Fecha de siembra:		14/10/2015													
Fecha de aislamiento:		19/10/2015													
N° Colonia	20/10/2015			21/10/2015			22/10/2015			23/10/2015			26/10/2015		
	PAS	Mm	St	PAS	Mm	St	PAS	Mm	St	PAS	Mm	St	PAS	Mm	St
30	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
44	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
45	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Las filas marcadas en verde, corresponden a las bacterias con buen crecimiento.

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

Estas colonias provienen sobretodo de las placas de Mm y PAS que por la mínima cantidad de nutrientes tardaron en crecer. Estas al igual que las anteriores fueron etiquetadas con los números arábigos siguientes a los del aislamiento anterior. Se reportó el crecimiento de cada colonia durante 6 días, tiempo en el que el tamaño de las colonias se mantuvo.

Como se observa en la Tabla 10, muchas de las colonias no lograron mantener el crecimiento, debido a que la reserva de nutrientes que trae consigo la bacteria se termina, a la falta de asimilación de nutrientes del medio nuevo, a estar expuesta a temperatura inadecuada o porque no son capaces de adaptarse a otro medio que no sea su lugar de origen. (Microbiología, 2009, <http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/tema02.pdf>)

- ***Bacterias aisladas a las 168 horas de la siembra***

Con el fin de contar con el mayor número posible de colonias aisladas y así aumentar las posibilidades de obtener las cepas más aptas para la evaluación de la capacidad de degradación de PCB's, se recuperaron las colonias que tardaron en crecer de cada una de las placas sembradas. La mayoría de las colonias expuestas en la Tabla 10, provienen de las placas de Mm y PAS duplicadas con diluciones de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . También se aislaron colonias pequeñas que se pudieron recuperar de las placas de PAS y STD sembradas con diluciones de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} .

Estas colonias al igual que las anteriores fueron aisladas a placas con STS, PAS y Mm y se reportó el crecimiento de cada una durante 3 días (Tabla 11).

Tabla 11. Tercer aislamiento de colonias bacterias a las 168 horas de crecimiento

Fecha de siembra:	14/10/2015								
Fecha de aislamiento:	21/10/2015								
N° Colonia	22/10/2015			23/10/2015			26/10/2015		
	PAS	Mn	St	PAS	Mm	St	PAS	Mm	St
72	+	-	+	+	+	+	+	+	+
73	-	-	-	-	-	-	+	-	-
74	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78	+	+	-	+	+	+	+	+	+
79	-	+	+	-	+	+	+	+	+
80	-	+	-	-	+	-	+	+	-
81	+	+	+	+	+	+	+	+	+
82	-	+	-	-	+	+	+	+	+
83	+	-	-	+	-	-	-	-	-
84	+	+	+	+	+	+	+	+	+
85	+	+	+	+	+	+	+	+	+
86	-	-	-	-	+	-	+	+	+
87	-	-	-	-	-	+	+	+	+
88	-	-	-	-	-	-	+	+	-
89	+	+	+	+	+	+	+	+	+
90	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92	+	+	+	+	+	+	+	+	+
93	-	-	+	-	-	+	+	-	+
94	+	+	+	+	+	+	+	+	+
95	-	-	-	-	-	-	+	-	-
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98	-	-	-	-	-	-	-	-	-
99	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+
101	-	-	-	-	-	-	-	-	-
102	+	+	+	+	+	+	+	+	+
103	+	-	-	+	-	+	+	-	+
104	-	+	-	-	+	-	-	+	-
105	-	+	-	-	+	-	+	+	-
106	-	-	-	-	-	+	-	-	+
107	-	-	-	-	-	-	-	-	-
108	-	-	-	-	-	-	-	-	-
109	-	-	-	-	-	-	-	-	-
110	-	+	-	-	+	-	-	+	-
111	-	-	-	-	-	-	-	-	-
112	-	-	-	-	-	-	-	-	-
113	-	-	-	-	-	-	-	-	-
114	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Las filas marcadas en verde, corresponden a las bacterias con crecimiento significativo.

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

Al cabo de 7 días de la siembra se contó con 114 colonias aisladas. A los 10 días, tras haber reportado el crecimiento, se observó la muerte de muchas de ellas como se indica en las tablas anteriores, y por ende, las colonias que superaron este primer proceso, se pasaron a placas nuevas. Las filas de color verde corresponden a las colonias que mantuvieron un buen crecimiento durante el proceso. Al final se contó con un total de 37 colonias, siendo estas las que pasaron al proceso de estabilización.

4.2.1.3. Estabilización de colonias

Para continuar con el estudio fue necesario estabilizar a las colonias aisladas repicándolos consecutivamente tres veces. La Tabla 12, resume los resultados de cada repique.

Al observar un alto número de células muertas durante el primer proceso, el primer repique se realizó únicamente en una placa con medio STD con la finalidad de brindar a las colonias sobrevivientes un medio rico para su mejor desarrollo. Como indica la Tabla 12, los siguientes repiques se realizaron en placas con medios Mm, PAS y STD, para evaluar el crecimiento de las colonias y observar su capacidad de estabilizarse en los tres medios.

Como se esperaba, todas las colonias crecieron en el primer repique en el medio STD. En el segundo repique, la colonia 78 tardó más en crecer en comparación a las demás colonias; la colonia 106 creció únicamente en el medio STD y las colonias resaltadas de rojo no crecieron en ninguna, estas últimas no fueron repicadas por tercera vez.

En general, las demás colonias mostraron variación en el crecimiento, la mayoría presentó mejor crecimiento en STD, sin embargo existieron colonias que crecieron en los tres medios y otras como la colonia 100 y 105 crecieron mejor en el Mm con aceite que en el medio STD. Mostrando así su capacidad de crecer a expensas del aceite contaminado con PCB's.

Tabla 12. Resultados de los repiques realizados.

REPIQUE 1		REPIQUE 2						REPIQUE 3		
26/10/2015		27/10/2015						29/10/2015		
Fecha de reporte		Fecha de reporte			Fecha de reporte			Fecha de reporte		
27/10/2015		28/10/2015			29/10/2015			30/10/2015		
N ^a Colonia	ST	Mm	PAS	ST	Mm	PAS	ST	Mm	PAS	STD
1	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
13	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
20	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
21	+	-	-	-	-	-	-	No repicado		
23	+	-	-	-	-	-	-	No repicado		
25	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	+	-	-	-	+	-	-	No repicado		
30	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
43	+	-	-	-	-	-	-	No repicado		
44	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
45	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
56	+	-	-	-	-	-	-	No repicado		
59	+	-	-	-	-	-	-	No repicado		
60	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
66	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
72	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
78	+	-	-	-	-	+	+	No repicado		
79	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
80	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
81	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
82	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
84	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
85	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
86	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
87	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
89	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
92	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
93	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
94	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
102	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
103	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
105	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
106	+	-	-	+	-	-	+	No repicado		
110	+	-	-	-	-	-	-	No repicado		
114	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Las filas marcadas en rojo, corresponden a las bacterias que fueron eliminadas por no presentar un crecimiento significativo.

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

El tercer repique se realizó con 28 colonias en los tres medios y todas sobrevivieron, estas colonias fueron aquellas que crecieron en el segundo repique.

4.2.1.4. Pruebas de Resistencia a Aceite contaminado con PCB's

Las 28 colonias anteriores fueron expuestas a un aceite de 43,6 ppm de PCB's, dosificados en volúmenes de 25 y 100 μ L a una temperatura de a 30°C. En la Tabla 13 las filas marcadas en rojo, corresponden a las bacterias que fueron eliminadas por no mostrar un crecimiento representativo frente a estas condiciones. La Ilustración 21 demuestra el crecimiento de las colonias.

Tabla 13. Colonias resistentes a aceite contaminado con 43, 6 ppm de PCB's

N° Colonia	Volumen de aceite: 25 μ L			Volumen de aceite: 100 μ L		
	Mm	PAS	STD	Mm	PAS	STD
1	-	+	+	+	-	+
13	-	-	+	-	-	+
20	-	+	+	+	+	+
25	-	-	+	-	-	+
26	+	+	+	+	-	+
30	+	-	+	-	+	+
44	+	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+	+
60	+	+	+	+	+	+
66	+	+	+	+	+	+
72	+	+	+	+	-	+
79	+	+	+	+	+	+
80	+	+	+	+	+	+
81	-	-	+	-	-	+
82	+	-	+	+	+	+
84	+	+	+	-	-	+
85	-	+	-	+	-	+
86	-	-	-	-	-	+
87	-	-	-	-	+	-
89	-	+	-	-	+	+
92	+	+	+	+	+	+
93	-	-	+	-	-	+
94	-	-	-	-	-	+
100	+	+	+	+	+	+
102	-	-	-	-	-	+
103	+	+	+	+	+	+
105	+	+	+	+	+	+
114	-	-	+	-	-	+

Las filas marcadas en rojo, corresponden a las bacterias que fueron eliminadas.

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

No se observaron diferencias significativas entre los dos tratamientos, por lo que se excluyeron aquellas que no mostraron un buen crecimiento, independientemente del tratamiento.

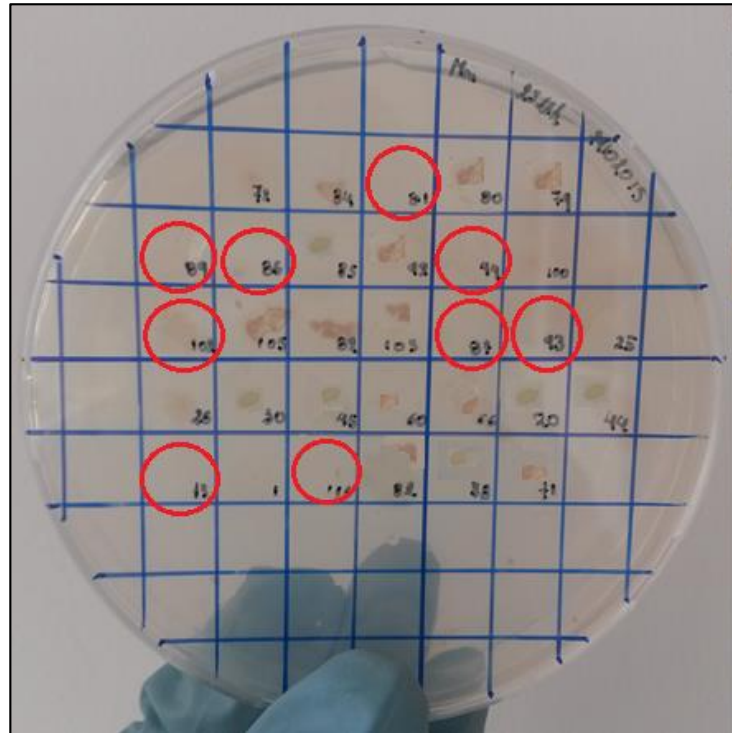


Ilustración 21. Crecimiento de las cepas en Mm con 25 µL de aceite (43,6 ppm de PCB's)

Los círculos rojos representan a las colonias con crecimiento mínimo o nulo.

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2015

Se eligieron las 19 colonias que mejor crecimiento mostraban y fueron expuestas a una muestra de aceite, con una concentración de 500ppm de PCB's estimada mediante el método del kit colorimétrico, dosificada en volúmenes de 150 y 250 µL, a una temperatura de 30°C, como se puede apreciar en la Tabla 14. En la Ilustración 21, se puede observar el crecimiento de las cepas en Mm con 25 µL de aceite contaminado con 43,6 ppm de PCB's.

Tabla 14. Colonias resistentes a aceite contaminado con PCB's (>500 ppm)

N° Colonia	Volumen de aceite: 150µL			Volumen de aceite: 250µL		
	Mm	PAS	ST	Mm	PAS	ST
1	-	-	+	-	-	+
20	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	-	-	+
26	+	+	+	+	+	+
30	+	-	+	-	-	+
44	+	+	+	-	+	+
45	+	+	+	+	+	+
60	-	-	+	-	-	-
66	+	+	+	+	+	+
72	+	+	+	+	+	+
79	+	+	+	+	+	+
80	+	+	+	+	+	+
82	-	-	+	-	-	+
84	-	+	+	-	-	+
85	+	+	+	+	+	+
92	+	+	+	-	+	-
100	+	+	+	+	+	+
103	+	+	+	+	+	+
105	+	+	+	+	+	+

La fila marcada en rojo, corresponden a la colonia que fue eliminada.

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

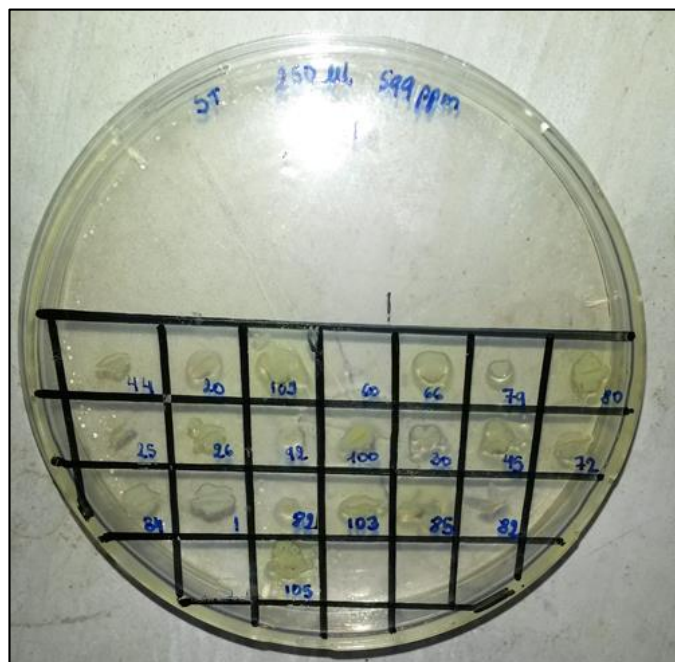


Ilustración 22. Crecimiento de las cepas en presencia de 250 µL de aceite contaminado con 500 ppm de PCB's, en medio STD.

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

Las placas con 250 μ L estuvieron prácticamente inundadas de aceite contaminado con PCB's como se puede apreciar en la Ilustración 22; aun así todas las colonias lograron crecer en al menos una de las placas, adaptándose o posiblemente metabolizando este compuesto.

Los registros de la Tabla 14, indican que las colonias 25, 84, 1 y 30 crecieron mejor en un volumen menor de aceite. La colonia 82 alcanzó a sobrevivir rodeado de aceite (250 μ L) pero únicamente en el medio STD, mientras las colonias 92 y 60 no crecieron en esta condición. Las colonias 60, 44, 25, 92, 30, 84, 1, 82 no crecieron en el Mm con mayor volumen de aceite y concentración de PCB's, siendo menos elegibles para evaluar su capacidad de degradar PCB's. Las demás colonias presentaron un buen crecimiento en todas las placas, a excepción de la colonia N° 60 por lo que fue excluida del proceso.

Habiendo obtenido 18 de colonias con un alto potencial para degradar PCB's se procedió a purificarlas mediante una siembra en placa por estriado, como se indicó en la técnica, para la posterior caracterización de cada una de ellas.


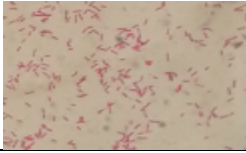

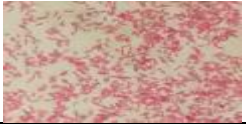




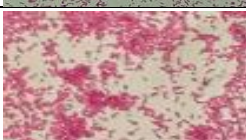


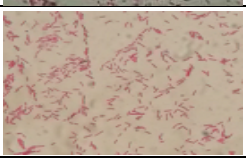
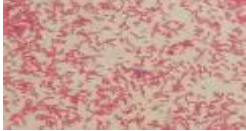

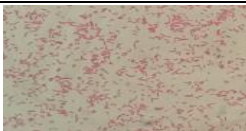


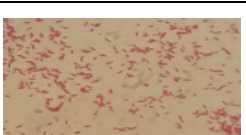
4.2.2. *Caracterización de las cepas bacterianas*

En la Tabla 15 se evidencia los resultados obtenidos tras la Tinción de Gram, que fueron necesarios para la determinar la pureza de cada colonia y definirlos dentro de alguno de los grupos: Gram Positivos o Gran Negativos.

La Tabla 16 indica la caracterización macroscópica de las 18 colonias que se mantienen en el estudio, atendiendo parámetros de forma, elevación, margen y color según el Anexo F.

4.2.2.1. Microscópica

Tabla 15. Caracterización Microscópica.

Nº CEPA	TINCIÓN GRAM	FOTO	Nº CEPA	TINCIÓN GRAM	FOTO
1	Bacilo Gram negativo		72	Bacilo Gram negativo	
20	Bacilo Gram negativo		79	Bacilo Gram negativo	
25	Bacilo Gram negativo		80	Cocobacilo Gram negativo	
26	Bacilo Gram negativo		82	Bacilo Gram negativo	
30	Bacilo Gram negativo		84	Bacilo Gram negativo	
44	Bacilo Gram negativo		85	Bacilo Gram negativo	
45	Bacilo Gram negativo		92	Bacilo Gram negativo	
66	Bacilo Gram negativo		100	Bacilo Gram negativo	
105	Bacilo Gram negativo		103	Bacilo Gram negativo	

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

4.2.2.2. *Macroscópica*

Tabla 16. Caracterización macroscópica de las cepas bacterianas

Nº CEPAS	FORMA	ELEVACIÓN	MARGEN	COLOR INTERNO	COLOR EXTERNO
1	Circular	Convexa	Entero	Crema	Crema
20	Circular	Convexa	Entero	Crema	Transparente
25	Circular	Plana	Entero	Crema	Crema
26	Circular	Convexa	Entero	Crema	Crema
30	Circular	Convexa	Entero	Crema	Crema
44	Circular	Convexa	Entero	Crema	Transparente
45	Circular	Convexa	Entero	Crema	Crema
60	Circular	Elevada	Entero	Blanca	Blanca
66	Circular	Convexa	Entero	Crema	Crema
72	Irregular	Plana	Ondulado	Crema	Crema
79	Circular	Convexa	Entero	Crema	Crema
80	Circular	Convexa	Entero	Crema	Claro
82	Circular	Convexa	Entera	Crema	Crema
84	Circular	Convexa	Entero	Crema	Crema
85	Fusiforme	Elevada	Entero	Crema	Crema
92	Circular	Convexa	Entero	Crema	Crema
100	Circular	Convexa	Entero	Crema	Crema
103	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Transparente
105	Circular	Convexa	Entero	Crema	Crema

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

4.2.2.3. Prueba de resistencia de las colonias a metales pesados

Tabla 17. Evaluación de la tolerancia a metales pesados de las cepas aisladas.

Nº CEPA	ARSÉNICO (500ug/ml)			CADMIO (500ug/ml)			COBRE (500ug/ml)			MERCURIO (100ug/ml)			PLOMO (500ug/ml)		
	Std	PAS + M	Tamaño	Std	PAS + M	Tamaño	Std	PAS + M	Tamaño	Std	PAS + M	Tamaño	Std	PAS + M	Tamaño
1	+	+	XXX	+	+	XX	+	+	X	+	+	XX	+	+	X
20	+	-		+	+	XX	+	-		+	+	X	+	-	
25	+	-		+	+	X	+	-		+	-		+	-	
26	+	+	X	+	+	XXX	+	+	XX	+	+	XX	+	+	XX
30	+	-		+	+	XX	+	+	X	+	+	XX	+	-	
44	+	-		+	+	XXX	+	+	X	+	-		+	+	XX
45	+	-		+	+	X	+	-		+	+	X	+	+	X
66	+	+	X	+	+	X	+	+	XX	+	+	X	+	-	
72	-	-		+	-		+	-		+	+	X	+	-	
79	+	+	XX	+	+	XX	+	-		+	+	X	+		
80	+	+	X	+	+	XX	+	+	X	+	+	X	+	+	XX
82	-	-		+	+	X	+	+	XX	+	-		+	+	X
84	+	-		+	+	X	+	+	XX	+	+	XX	+	+	XX
85	+	+	XX	+	+	X	+	-		+	-		+	-	
92	+	-		+	-		+	-		+	+	X	+	-	
100	+	-		+	+	XX	+	+	XX	+	+	X	+	+	X
103	+	+	XX	+	-		+	-		+	+	X	+	-	
105	+	+	XXX	+	+	X	+	+	X	+	+	XXX	+	+	X

Las “x” representa el tamaño de la colonia, de esta forma. **X**: Pequeño ($\varnothing \leq 1\text{mm}$); **XX**: Mediano ($\varnothing = 4\text{mm}$) y **XXX**: Grande ($\varnothing \geq 4\text{mm}$); “M” representa el metal.

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

Debido a que en los aceites minerales puede existir la presencia de metales pesados se decidió realizar la evaluación de la tolerancia a metales pesados de las cepas aisladas. El plomo, mercurio, arsénico, cobre y cadmio son metales pesados que son liberados comúnmente en varias industrias, convirtiéndose en compuestos elevadamente tóxicos y peligrosos, para la salud y ambiente. (Scheiner et al., 1989, p. 209). Muchas bacterias Gram Negativas han sido estudiadas para probar su resistencia frente a varios metales pesados, demostrando que una cepa puede ser capaz de resistir medios completamente hostiles y aun así sobrevivir. (Moraga, 2003, p. 91).

Con la finalidad de crear un criterio más de selección relacionado a la capacidad de las bacterias a sobrevivir en medios hostiles parecidos al aceite dieléctrico con PCB's, las 18 bacterias fueron sometidas a concentraciones de metales pesados. La Tabla 17 muestra el crecimiento de las cepas en presencia de metales.

Todas las cepas a excepción de la 72 y 82 fueron capaces de crecer en el medio STD. Las cepas 105, 80, 26 y 1 presentaron crecimiento en todas las placas con medio PAS suplementados con los metales pesados descritos en la Tabla 17.

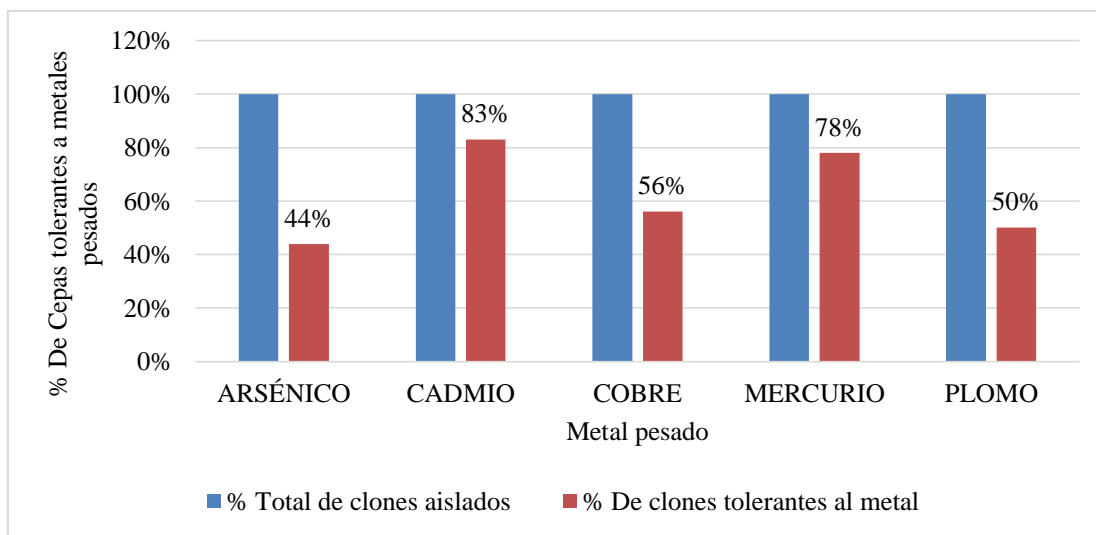


Ilustración 23. Porcentajes de las cepas tolerantes a metales pesados.
Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

En el medio PAS suplementado con el metal pesado, todos las cepas aislados fueron capaces de crecer en al menos una de las pruebas, siendo el medio con cadmio donde mejor crecieron la mayoría de las cepas, con un 83% del total (Ilustración 23), seguido por el mercurio con el 78%. Mientras que el arsénico con un 44% de crecimiento resultó ser el metal más restrictivo para el desarrollo de las cepas.

4.2.2.4. Capacidad de crecimiento a temperatura ambiente

Tabla 18. Crecimiento de las cepas a temperatura ambiente (17 °C) durante 48 horas.

N ^a De Colonia	Mm	PAS	STD
1	-	+	+
20	-	+	+
25	-	+	+
26	+	+	+
30	-	+	+
44	-	-	+
45	-	-	+
66	-	-	+
72	+	-	+
79	-	-	+
80	-	+	+
82	-	+	+
84	-	+	+
85	-	-	+
92	-	+	+
100	+	+	+
103	-	+	+
105	+	+	+

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

La meta de cualquier estudio de este tipo, es aislar bacterias viables para que en un próximo estudio se las pueda emplear en proyectos de biorremediación. Es por ello que estas colonias fueron repicadas en tres placas con distintos medios (Mm, PAS y STD) para probar su

crecimiento a temperatura ambiente, 17 °C (temperatura promedio de Riobamba durante los meses de experimentación, Anexo G), semejante a la temperatura de donde proceden (conveniente para un tratamiento *in situ*). Se reportó el crecimiento de las colonias a las 48 horas como se comprueba en la Tabla 18.

Como se observa en la Tabla 18, la temperatura ambiente no restringió el crecimiento de ninguna colonia en el medio STD, sin embargo les tomó un tiempo mayor de crecimiento (48 horas) en comparación con las condiciones (24 horas a 30 °C) usadas en este estudio. Las colonias 44, 79, 45, 72 y 85 de la placa con medio PAS, no crecieron durante las 48 horas. En el medio Mm fueron pocas las colonias que crecieron, pero bajo este criterio, son las que mejor adaptación demostraron, este fue el caso de las colonias 100, 105, 26 y 72. Así se obtuvieron 18 colonias que fueron caracterizadas para dar paso al siguiente proceso.

4.2.3. Identificación mediante pruebas bioquímicas

Se estableció el género y especie de las colonias, la Tabla 19 muestra a detalle el resultado de cada prueba y la denominación a la que se llegó según los resultados, además con estas pruebas se aseguró que muchas de estas cepas se repetían, en resumen se determinaron siete cepas bacterianas correspondientes a: *Providencia alcalifaciens*, *Proteus mirabilis*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Pseudomona alcaligenes*, *Morganella morganii*, *Shigella dysenteriae*. Para determinar la especie a las que cada cepa correspondía se compraron los resultados de las pruebas bioquímicas con tablas que mueran las características y diferencias entre especies bacterianas (Alvarez y Boquet, 2002). Anexo H y Anexo I.

Tabla 19. Identificación bioquímica de cepas bacterianas.

Nº cepa	Oxidasa	Catalasa	CITRATO DE SIMMON	KLIGER				LISINA DESCARBOXILASA	MANITOL	SIM			UREA	ESPECIE
				Glucosa	Gas/Glucosa	Lactosa	SH ₂			Motilidad	Indol	SH ₂		
1	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	
20	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	<i>Proteus mirabilis</i>	
25	-	+	+	-		-		-	-	+		+	<i>Proteus mirabilis</i>	
26	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	<i>Providencia stuartii</i>	
30	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	<i>Morganella morganii</i>	
44	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	<i>Providencia alcalifaciens</i>	
45	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	<i>Proteus mirabilis</i>	
66	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	<i>Proteus mirabilis</i>	
72	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	<i>Proteus mirabilis</i>	
79	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	<i>Proteus mirabilis</i>	
80	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	<i>Providencia stuartii</i>	
82	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	<i>Providencia alcalifaciens</i>	
84	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	<i>Proteus mirabilis</i>	
85	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	<i>Proteus mirabilis</i>	
92	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	<i>Proteus mirabilis</i>	
100	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	<i>Pseudomona alcaligenes</i>	
103	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	<i>Proteus mirabilis</i>	
105	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>Providencia rettgeri</i>	

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

4.3. Fase III: Evaluación de degradación de PCB's, mediante una prueba in vitro

4.3.1. *Selección de un medio de cultivo líquido óptimo para la masificación de las cepas*

Las cepas bacterianas purificadas fueron inoculadas en un medio líquido. Para este paso se probaron tres medios: PAS líquido, peptona y caldo tripticasa de soya. Tras 24 horas de incubación a 30 °C, se evaluaron características como turbidez, opacidad y presencia de sedimento para elegir aquel medio líquido que aporte nutrientes suficientes para obtener un crecimiento exponencial de las bacterias. (Moreno, 2009, pág. 3).

En los medios de peptona y agar tripticasa de soya se obtuvieron soluciones más o menos densas por la presencia de bacterias, e incluso se vio un depósito de células en el fondo de los tubos que se resuspendían al agitar. Sin embargo, en el medio PAS estas características no pudieron ser apreciadas.

El medio de crecimiento de las bacterias debía ser lo más parecido al lugar del que éstas provienen, es decir con nutrientes limitados; por dicha razón se consideró que la peptona otorga el sustento nutricional básico y suficiente para el crecimiento y masificación de las cepas. La tripticasa de soya se descarta por ser un medio muy rico en nutrientes lo que aseguraría inicialmente el crecimiento de microorganismos, sin embargo posterior a la masificación las bacterias pueden estresarse y morir por la falta de los nutrientes que en un inicio les otorgaba este medio. Por otro lado el medio PAS, tras observar el resultado del ensayo, no garantizaba la masificación de bacterias.

4.3.2. Criterios de selección de cepas bacterianas

Tabla 20. Criterios de selección de las cepas para pruebas in vitro.

Número de cepa (Género y Especie) Criterios de Selección	44/ 82 (<i>Providencia alcalifaciens</i>)	20/66/79/25/ 92/45/72/84/ 103/85 (<i>Proteus mirabilis</i>)	105 (<i>Providencia rettgeri</i>)	80/26 (<i>Providencia stuartii</i>)	100 (<i>Pseudomona alcaligenes</i>)	30 (<i>Morganella morganii</i>)	1 (<i>Shigella disenteriae</i>)
Patógenas	No	No	No	No	No	No	No
Cumplen con la adaptación y estabilización	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Tamaño de la colonia.	X	Xx	Xxx	Xxx	Xxx	Xx	Xx
Tiempo de crecimiento.	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas
Crecimiento a temperatura ambiente en Mm	No	No (A excepción de la 72)	Si	Si	Si	No	No
Crecimiento en Mm con 250 µL de aceite dieléctrico contaminado con 599 ppm de PCB's	No	Si (A excepción de la cepa Nº 25, 92 y 84)	Si	Si	Si	No	No
Resistencia a As	No	No	Si	Si	No	No	Si
Resistencia a Cd	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Resistencia a Cu	Si	No	Si	Si	Si	Si	Si
Resistencia a Hg	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Resistencia a Pb	Si	No	Si	Si	Si	No	Si
Cultivo en caldo (turbiedad)	X	XX	XXX	XXX	XXX	X	XX

Las "x" en el tamaño de colonia representa **X**: Pequeño ($\varnothing \leq 1\text{mm}$) ; **XX**: Mediano ($\varnothing = 4\text{mm}$) y **XXX**: Grande ($\varnothing \geq 4\text{mm}$)

Las "x" en el crecimiento en el medio líquido representan el nivel de turbiedad, siendo **X**: Bajo; **XX**: Medio; **XXX**: Alto

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

En la Tabla 20, se pueden apreciar los criterios que se emplearon para seleccionar las cepas para el experimento in vitro; los registros de la cepas 100, 105 y 26 ayudaron a fundamentar su elección.

Al final de la segunda fase se purificaron y caracterizaron 18 cepas, debido a que resistieron a cada uno de los ensayos aplicados durante el proceso lo que demuestra que estas cuentan con potencialidad para degradar PCB's, sin embargo, debido a las complicaciones en cuando a costos y tiempo que se presentaban para trabajar con todas se hizo una selección de aquellas con las características más sobresalientes y de cierto modo más relevantes frente a las demás.

El tamaño de cada colonia durante los ensayos tuvo un peso relevante, puesto que al comparar su crecimiento (todas en medio mínimo y al mismo tiempo) y observar que unas fueron más grandes que otras se pudo deducir que se debía a un crecimiento más rápido y con ello una mejor asimilación de los nutrientes aportados al medio, entre ellos los PCB's. Los tamaños de las colonias se puede observar en la Ilustración 24.

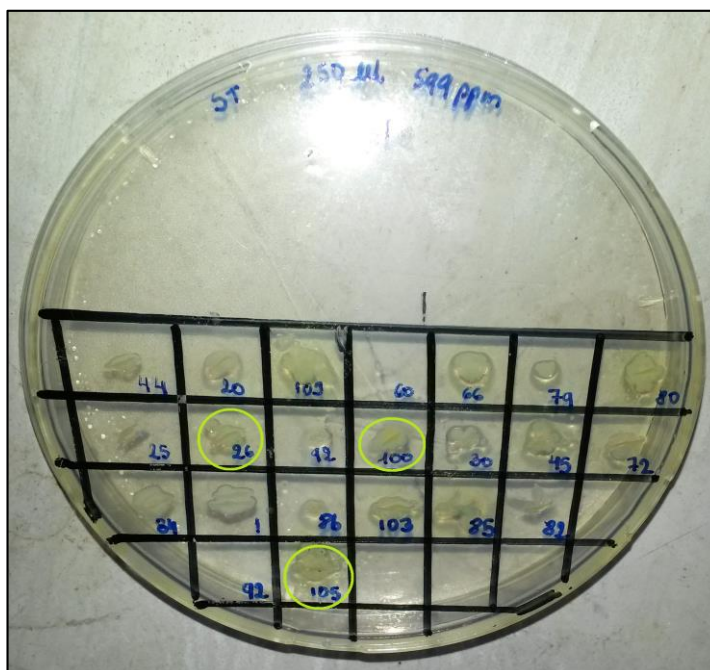


Ilustración 24. Bacterias seleccionadas.

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2015

El tiempo de crecimiento fue un factor importante, a la mayoría de las bacterias después de ser recuperadas de la placa correspondiente a la primera siembra, les costó crecer en el medio mínimo y PAS, mientras que las cepas seleccionadas: *Pseudomona alcaligenes*, (100) *Providencia rettgeri* (105) y *Providencia stuartii* (26) mostraron un crecimiento bastante bueno desde los primeros ensayos en los tres medios, resistiendo desde el principio al agente contaminante. Este proceso se puede verificar en las Tablas 9, 10, 11 y 12; mientras que las Tablas 13 y 14 corroboran la resistencia a mayor concentración de PCB's.

El crecimiento de las colonias puras a temperatura ambiente, dio resultados positivos en el medio STD. Se observa en la Tabla 18, que: *Pseudomona alcaligenes* (100), *Providencia rettgeri* (105) y *Providencia stuartii* (26) crecen también en el medio Mm y PAS, potenciándose para ser elegidas, puesto que tienen un punto a favor si se estudia posteriormente su uso para un tratamiento *en situ* y con mínimas cantidades de nutrientes.

Para complementar la elección de estas cepas se investigó que Moraga (2003), concluye que la bacteria *Pseudomona alcalígenes* es capaz de resistir a metales como Pb, As, Ni, Cu, Hg, Zn, Cr y Cd con concentraciones de >3.200; >3.200; 10; 800; 200; 3.200; 400 3.200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente; lo que aporta argumentos para su elección. Hanssen, reportó a *Pseudomonas aeruginosa* y *Providencia rettgeri* como las más tolerantes a cobre, pues estas crecieron frente a una concentración de 1,8 y 1,6 mM, respectivamente, haciéndolas viables para su uso en biorremediación. (Hanssen *et al.*, 1998; citado en González, 2009, p. 18)

Serrano (2014, p. 106), en su trabajo de titulación, encuentra a *Providencia stuartii* en sedimentos de la laguna de Colta y concluye, una vez realizadas las pruebas y con los resultados obtenidos, que esta bacteria entre ocho más son óptimas para conformar un consorcio bacteriano nativo, para reducir la contaminación del sedimento dragado de la laguna; esto es, para efectos de biorremediación.

4.3.3. Masificación de las cepas bacterianas (caldo madre)

Cada cepa fue masificada en las mismas condiciones de: Temperatura (30°C), tiempo de incubación (24 horas), medio de líquido de cultivo (agua de Peptona). La concentración celular obtenida después de este periodo varía en cada caso, debido a la fisiología de cada bacteria. Sin embargo para cada caso este valor es bueno, Serrano (2014), asegura que con la masificación, es necesario alcanzar una concentración celular óptima (del orden 10⁸ UFC/mL) para la dosificación bacteriana en cualquier matriz sólida.

Tabla 21. Concentración celular obtenida de la incubación a 30°C por 24 horas.

CEPA	Tiempo de incubación	Temperatura	*Abs (625 nm)	**UFC/MI
<i>Pseudomona alcaligenes</i>	24 h	30°C	1,048	2,4E+09
<i>Providencia rettgeri</i>	24 h	30°C	0,676	1,5E+09
<i>Providencia stuartii</i>	24 h	30°C	0,768	1,8E+09

* Absorbancia

**UFC/mL estimado según la escala estándar de McFarland.

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

4.3.4. Evaluación de la reducción de PCB's por acción de las bacterias, en una prueba *in vitro*

Para este experimento se contó con un grupo control compuesto por 50 gramos de arena con 2,5 mL de aceite dieléctrico contaminado con PCB's, cuya caracterización se encuentra en el Anexo C. Este aceite se utilizó para todo el experimento *in vitro*, mediante el cual se evaluó la capacidad de las bacterias para degradar PCB's de aceites contaminados.

Los resultados del análisis de PCB's del grupo control y de las unidades experimentales: UA, UB y UC emitidos por el LAB-CESTTA fueron en parámetros de Aroclor 1242, Aroclor 1254, y Aroclor 1260, teniendo valores altos de Aroclor 1254 (Anexo J, K, L y M respectivamente), por lo que se valoró la reducción de PCB's en esta forma.

Tabla 22. Resultados de la prueba in vitro para la evaluación de reducción de PCB's.

Unidad experimental	Inóculo (UFC/mL)	*PCB's inicial	*PCB's final	Reducción	% Reducción	**Estimación (%)
G	0	0,80	0,80	0	0	0
UA	24x10 ⁸	0,97	0,65	0,32	33	33
UB	15x10 ⁸	0,84	0,62	0,22	26	42
UC	18x10 ⁸	0,75	0,66	0,09	12	16

* PCB's medido como aroclor 1254

** Cálculo estimado para una concentración de inóculo igual a 24x10⁸ para A, B y C

UA (Unidad experimental con la cepa A), UB (Unidad experimental con la cepa B), UC (Unidad experimental con la cepa C)

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

Los resultados de los análisis efectuados para medir la concentración de PCB's en el grupo control y en las unidades experimentales: UA, UB y UC a los 42 días de haber empezado el experimento, se encuentran adjuntos en los Anexos N, O, P y Q respectivamente.

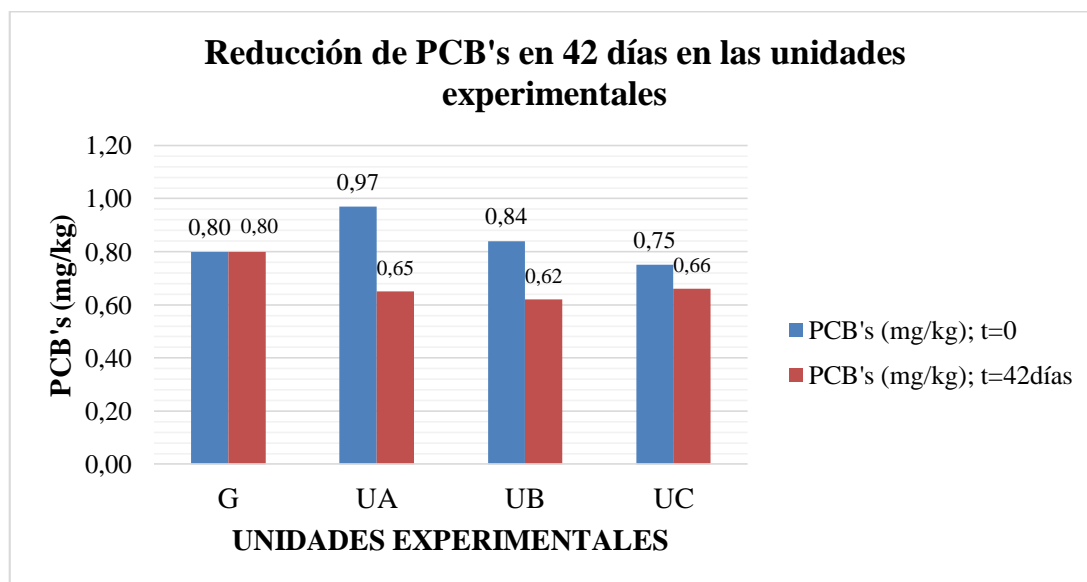


Ilustración 25. Reducción de la concentración de PCB's a los 42 días por las 3 cepas.

La concentración inicial de PCB's en el grupo control fluctuaba en valores aceptables de $\pm 0,1$

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

En la Tabla 22 y en la Ilustración 25, se observa que entre las tres cepas bacterianas, la que presenta mayor reducción de PCB's (Aroclor 1254) es *Pseudomona alcaligenes* (N° 100) en un 33%, seguida de *Providencia rettgeri* (N° 105) en un 26 % y *Providencia stuartii* (N° 26) en 12%. En un estudio similar realizado por Payne et al (2013), se alcanza una reducción del 80 % de PCB's después de 365 días, los 120 primeros días corresponde a una fase anaeróbica en la se degrada el 56%; los siguientes 245 días corresponden a la fase aeróbica donde se degrada un 24 %. En nuestro caso, *Pseudomona alcaligenes* redujo aeróbicamente 33% de PCB's en 42 días, y *Providencia rettgeri* un 26 % en el mismo periodo, dando buenos resultados en un menor tiempo que en el estudio anterior.

Debido a la fisiología de cada bacteria no se logró alcanzar una concentración celular inicial igual para cada cepa. Sin embargo, se pudo hacer un breve análisis sobre lo que pasaría si todas las unidades experimentales hubiesen empezado con la misma concentración de bacterias. En la Columna 7 de la Tabla 22, se observa que *Providencia rettgeri* pudo haber superado el porcentaje de reducción de *Pseudomona alcaligenes*, mientras que *Providencia stuartii*, mantendría su porcentaje de reducción por debajo del de las dos cepas anteriores.

Cabe recalcar que el análisis inicial y final de la concentración de PCB's en el grupo control (G) compuesto únicamente por aceite contaminado y arena permitió asumir que la reducción de la concentración de PCB's en la unidades experimentales UA, UB y UC, es justificada únicamente por la acción de las bacterias, ya que en el grupo control la concentración de PCB's es igual en la medición inicial y al final.

4.3.5. *Recuento bacteriano de las unidades experimentales*

Para asegurar la acción del microorganismo en la reducción de concentración de Aroclor, se realizó un recuento de microorganismo a los 18 y 42 días del inicio del experimento. La Tabla 23 contiene a detalle la concentración celular a cada tiempo propuesto.

Tabla 23. Recuento del número de colonias en las placas durante el experimento.

CEPAS	*t= 0 (UFC/mL)	t= 18 días (UFC/mL)	t= 42 días (UFC/mL)
A _{mo}	24x10 ⁸	3,3x10 ⁶	2,0x10 ⁵
UA ¹	24x10 ⁸	3,3x10 ⁷	3,6x10 ⁶
UA ²	24x10 ⁸	3,2x10 ⁷	3,7x10 ⁶
B _{mo}	15x10 ⁸	3,6x10 ⁷	2,1x10 ⁵
UB ¹	15x10 ⁸	3,6x10 ⁶	3,0x10 ⁵
UB ²	15x10 ⁸	3,3x10 ⁶	3,1x10 ⁵
C _{mo}	18x10 ⁸	3,8x10 ⁷	2,8x10 ⁶
UC ¹	18x10 ⁸	3,9x10 ⁵	3,6x10 ⁵
UC ²	18x10 ⁸	3,7x10 ⁵	3,4x10 ⁵

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

4.3.5.1. Crecimiento de *Pseudomona alcalígenes* durante la prueba *in vitro*

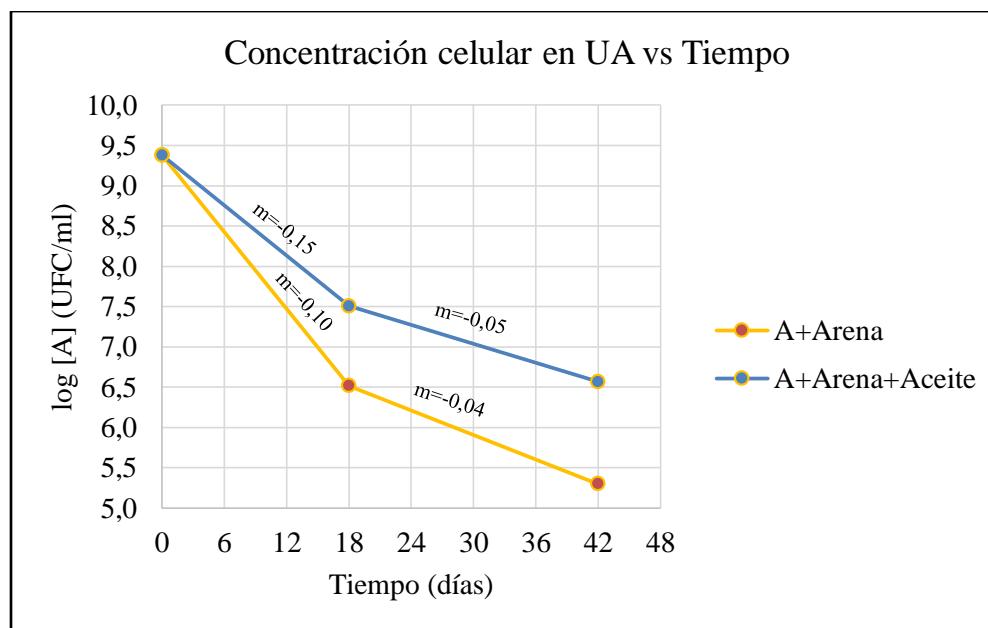


Ilustración 26. Crecimiento de la cepa A durante el tiempo de experimento.

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

La Ilustración 26, muestra que el crecimiento celular de *Pseudomona alcaligenes* es mayor en presencia de aceite dieléctrico contaminado con PCB's, lo que indica que posiblemente la bacteria lo está utilizando para su desarrollo.

En los primeros 18 días los valores de las pendientes de las dos rectas son mayores a las pendientes de los días posteriores, esto demuestra que la muerte celular es más acelerada en este periodo, provocando un descenso de la concentración celular. Este comportamiento puede ser fácilmente explicado, pues al añadir el caldo madre en 50g de arena la concentración del inóculo disminuye, además de que las bacterias deben pasar primero por un proceso de adaptación. En la segunda etapa también se observó una disminución de microorganismos, sin embargo la pendiente es menos pronunciada, lo que nos lleva a entender que la bacteriana se ha ido adaptando al medio experimental (arena+ aceite) y a los 42 días *Pseudomona alcaligenes*, ha reducido PCB's de 0,97 a 0,65 mg/kg.

4.3.5.2. Crecimiento de *Providencia rettgeri* durante la prueba *in vitro*

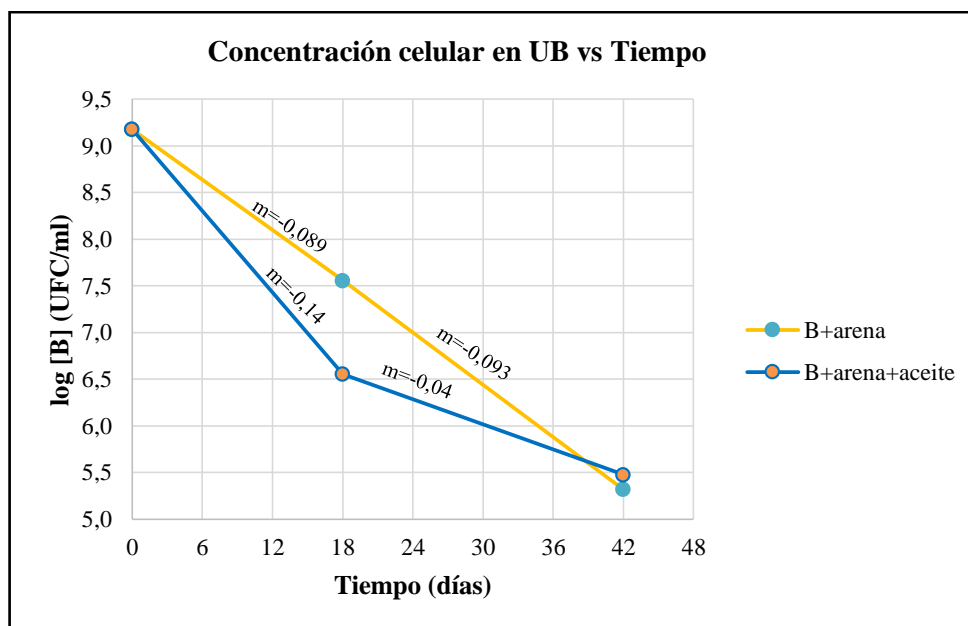


Ilustración 27. Crecimiento de la cepa B durante el tiempo de experimento.
Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

La Ilustración 27 acerca de *Providencia rettgeri*, permite interpretar que el crecimiento de esta bacteria es menor en presencia del aceite. En presencia de aceite contaminado con PCB's, en los primeros 18 días se ve un descenso significativo de 15×10^8 a $3,6 \times 10^6$ UFC ($m = -0,14$), a partir de este momento el descenso continúa en menor ritmo ($m = -0,04$), hasta aproximadamente los 39 días, en este punto la curva comienza a estabilizarse y se sobrepone al control, lo que posiblemente indica que tras haber superado el cambio de ambiente las bacterias sobrevivientes empiezan a adaptarse, de tal modo que en un periodo de 42 días, la acción de *Providencia rettgeri* ha reducido PCB's de 0,84 a 0,62 ppm en la unidad experimental.

4.3.5.3. Crecimiento de *Providencia stuartii* durante la prueba in vitro

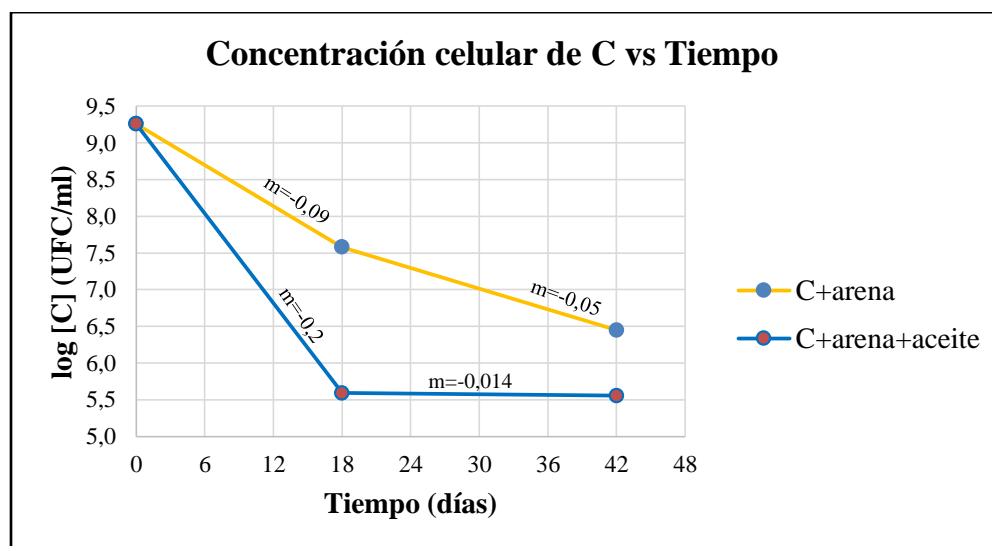


Ilustración 28. Crecimiento de la cepa B durante el tiempo de experimento.
Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

La Ilustración 28, indica que durante el primer recuento de bacterias, a *Providencia stuartii* le cuesta más crecer en presencia de aceite, que a las dos bacterias anteriores. Durante este periodo pasa por una muerte celular bastante acelerada ($m = -0,2$) en relación a las otras bacterias en estudio. En el segundo recuento, el crecimiento sigue en descenso pero el valor

de la pendiente de la recta en muy baja (-0,0014), demostrando así su asimilación y adaptación al medio.

Sin embargo, esta bacteria crece mejor en un medio sin aceite, aprovecha al principio los nutrientes más fáciles de obtener, y una vez agotadas las reservas empieza, a aprovechar el contaminante. De tal modo que al cabo de 42 días fue capaz de reducir PCB's de 0,75 a 0,66 ppm en la unidad experimental, siendo la unidad experimental en el que se obtuvo una menor reducción de los PCB's. Lo observado explica por qué en este caso se aprecia una menor degradación de PCB's.

4.3.6. *Control de las condiciones ambientales*

Tabla 24. Control de las condiciones ambientales durante el experimento in vitro.

	Al día 0			Al día 18			Al día 42		
Cepa	pH	°T	Humedad	pH	°T	Humedad	pH	°T	Humedad
Amo	5,39	30°C	56%	5,44	30°C	50%	5,42	30°C	46%
Bmo	5,76	30°C	54%	5,81	30°C	49%	5,68	30°C	45%
Cmo	5,78	30°C	56%	5,83	30°C	51%	5,78	30°C	47%
UA	5,61	30°C	58%	5,66	30°C	54%	5,69	30°C	49%
UB	5,66	30°C	56%	5,66	30°C	53%	5,69	30°C	47%
UC	5,60	30°C	57%	5,64	30°C	53%	5,83	30°C	46%

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

Todos los valores de la Tabla 24 fueron mantenidos en las condiciones recomendadas bibliográficamente para bacterias que han logrado degradar PCB's (Bopp, 1986), proporcionado así un medio adecuado para el crecimiento de las estas en cada matriz y la incorporación de PCB's a su metabolismo.

CONCLUSIONES

- Se aislaron cepas bacterianas a partir de suelo de la Central Hidroeléctrica “Alao” de la Empresa Eléctrica Riobamba S.A. y se caracterizaron atendiendo parámetros de adaptación a medios contaminados con PCB’s, resistencia a diferentes concentraciones de aceite dieléctrico contaminado con PCB’s, características macroscópicas y microscópicas, capacidad de degradación y resistencia a metales pesados.
- Mediante el uso de tres medios: Agar para métodos estándar, PAS y Medio Mínimo, se aislaron 18 cepas bacterianas a partir de suelos de la Central Hidroeléctrica “Alao”, las cepas fueron aisladas bajo la presión selectiva de concentraciones crecientes de PCB’s contenidos en aceite dieléctrico.
- Mediante la aplicación de pruebas bioquímicas se identificaron 18 cepas bacterianas correspondientes a las especies: *Providencia alcalifaciens*, *Proteus mirabilis*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Pseudomona alcaligenes*, *Morganella morganii*, *Shigella disenterii*.
- Las cepas bacterianas seleccionadas para evaluar la biodegradación de PCB’s fueron: *Pseudomona alcaligenes*, *Providencia rettgeri* y *Providencia stuartii*. Estas bacterias fueron elegidas de acuerdo a criterios recolectados como crecimiento en condiciones mínimas de nutrientes, resistencia a los PCB’s, tamaño de las colonias, crecimiento a temperatura ambiente y resistencia a metales pesados; durante la primera y segunda fase del estudio.
- El porcentaje de eficiencia en la reducción de la concentración de PCB’s como Aloclor 1254 a los 42 días fue: del 33% por *Pseudomona alcaligenes*, del 26% por *Providencia rettgeri* y del 12 % por *Providencia stuartii*.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda que para posteriores investigaciones relacionadas, establecer periodos de degradación superiores a los 42 días y mediciones periódicas, con la finalidad de obtener una curva que determine el tiempo exacto de degradación.
- Debido a que este es un estudio nuevo dentro de la institución e incluso a nivel nacional se sugiere continuar una la investigación a fin de buscar extrapolar las condiciones de la prueba in vitro a una planta piloto, controlando los factores ambientales, así como también la estabilización del crecimiento celular de *Pseudomona alcaligenes*, *Providencia rettgeri* y *Providencia stuartii*, con el fin de lograr mayores porcentajes de degradación.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ABRAHAM, Wolf-Rainer, et al.** Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Current opinion in microbiology*, vol. 5, nº 3, Washington – Estados Unidos de América, 2002, p. 246-253.
2. **ALEXANDER, M.** *Biodegradation and Bioremediation*. Londres – Inglaterra, Academic Press, 1999, pp. 138-139.
3. **ARBELI, Z.** Biodegradación de compuestos orgánicos persistentes (COP): I. El caso de los PCB's. *Unal*, vol 14, nº 1, Bogotá – Colombia, 2009, pp. 55-86.
4. **BAIRD, C.** Química Ambiental [en línea]. Barcelona – España: Reverté, 2001. [Consulta: 17 enero 2015]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books>.
5. **BALÓN, Lucía; et al.** Identificación de especies bacterianas. México DF – México, Balam, 2015, p. 235.
6. **BOPP, Lawrence H.** Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. *Journal of Industrial Microbiology*, vol. 1, no 1, Washington – Estados Unidos de América, 1986, p. 23-29.
7. **CALDERÓN, F. MEDIOS DE SOPORTE PARA ESTUDIOS EXPERIMENTALES DE BIORREMEDIACIÓN.** Bogotá – Colombia, 2002

http://www.drcaalderonlabs.com/Publicaciones/Los_Sustratos.htm
2015-11-12

8. **COLOMBIA. INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO.** *Seguridad e Higiene en el Trabajo* [En línea]. Bogotá – Colombia, 2009. [Consulta: 21 de diciembre del 2015].

Disponible en:

http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/Valores_Limite/Doc_Toxicologica/Ficheros/DLEP02.pdf

9. **CONAMA.** *Sistema de Información Ambiental de Chile* [En línea]. 2004. [Consulta: 21 de diciembre del 2015].

Obtenido de: http://www.sinia.cl/1292/articles-37249_recurso_1.pdf

2015-11-12

10. **CORRALES, G.** (Dirección). *Cromatógrafo de gases* [Película]. (2014).

11. **DE LA GARZA, José Antonio Rodríguez, et al.** Biodegradación de bifenilos policlorados a distintas temperaturas mediante biopelículas microbianas. En *XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras*, Barcelona – España, 2009, p. 21-26.

12. **DOMÉNECH, A. MEDIOS DE CULTIVO.** Islas Baleares – España. 2014

<http://www.uib.es/depart/dba/microbiologia/seminarios/1%20Medios%20de%20cultivo.pdf>

2015-07-11

13. **ECUADOR. ASAMBLEA CONSTITUYENTE.** Constitución del Ecuador, Manabí– Ecuador, 2008, p. 52
http://www.asambleanacional.gov.ec/documentos/constitucion_de_bolsillo.pdf
2016-02-19
14. **ECUADOR. CONGRESO NACIONAL.** Ley de Gestión Ambiental, Quito – Ecuador, 2004, pp. 7
15. **ECUADOR. COORPORACIÓN NACIONAL DE ELECTRICIDAD (CONELEC).** *Manual de Procedimientos para el Manejo de Bifenil Policlorados (PCB's) en el Sector Eléctrico Ecuatoriano* [En línea]. 2012. [Consulta: 21 de diciembre del 2015]. Obtenido de: <http://geoportal.conelec.gob.ec/visor/index1.html>
16. **ECUADOR. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.** Transformadores, Aceites Aislante para transformadores e interruptores. Requisitos, Quito – Ecuador, 1998, p. 4
<https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2133.1998.pdf/ACO/17122014/nte-inen-1205-1.pdf>
2016-01-08
17. **ECUADOR. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.** Transporte, Almacenamiento y Manejo de Materiales Peligrosos. Requisitos, Quito – Ecuador, 2013, p. 1
18. **ECUADOR. NORMAS TÉCNICAS ECUATORIANAS INEN: 1205.** *Agua. Determinación del número de bacterias en placa*, Quito – Ecuador, 2003, p. 234

19. **ECUADOR. MINISTERIO DEL AMBIENTE REPÚBLICA DEL ECUADOR (MAE).** Texto Unificado de Legislación Secundaria. Quito – Ecuador, 2007.
http://www.efficacitas.com/efficacitas_es/assets/Registro%20Oficial%20Normas%20Tecnicas%20Ambientales.pdf
2016 -02-20

20. **ECUADOR. MINISTERIO DEL AMBIENTE REPÚBLICA DEL ECUADOR (MAE).** Acuerdo Ministerial 146 “Los Procedimientos para la Gestión Integrada y Ambientalmente Racional de los Bifenilos Policlorados (PCB) en el Ecuador”, Quito-Ecuador, 2016, p. 9.
<http://www.ambiente.gob.ec/>
2016-02-2016

21. **ECUADOR. MINISTERIO DEL AMBIENTE REPÚBLICA DL ECUADOR.** Conciencia sobre PCB’s, Quito– Ecuador, 2015, pp. 3, 7,13
2016-02-19

22. **ECUADOR. MINISTERIO DEL AMBIENTE DEL ECUADOR (MAE).** *Concienciación sobre PCB’s* [En línea]. Quito – Ecuador, 2015.
[Consulta 21 de diciembre del 2015]. Disponible en: www.ambiente.gob.ec

23. **ECUADOR. SUBCOMITÉ TÉCNICO PARA LA GESTIÓN DE PCB’s.** Manual de Procedimientos para el Manejo de Bifenilos Policlorados (PCB’s) en el Sector Eléctrico Ecuatoriano, Quito – Ecuador, 2012, pp. 8-9.
<https://maeorellana.files.wordpress.com/>
2016-02-2016

24. **ESPAÑA. MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE DE ESPAÑA** [En línea]. Barcelona – España, 2015.
[Consulta 21 de diciembre del 2015].
Disponible en:
http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/publicaciones/COPs_tcm7-284041.pdf
25. **ESPAÑA. MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE DE ESPAÑA** [En línea]. Barcelona – España, 2015.
[Consulta 21 de diciembre del 2015].
Disponible en: http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/publicaciones/COPs_tcm7-284041.pdf
26. **ESPAÑA. UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA.** Microbiología.
Navarra - España, 2009.
<http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/tema02.pdf>
2016-01-01
27. **ESPINAL, G.** *Manual de Prácticas de Microbiología*. Santo Domingo – República Dominicana, INTEC, 2005, p. 14.
28. **ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA).** *Arocloros de PCB's* [En línea]. 2013. [Consulta 23 de diciembre del 2015]. Disponible en: <http://www3.epa.gov/epawaste/hazard/tsd/pcbs/pubs/aroclor.htm>

29. **FERNÁNDEZ, A. et al. PROCEDIMIENTOS DE MICROBIOLOGÍA.**
Barcelona – España. 2010
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
2015-21-12

30. **GARCÍA, V. Introducción a la Microbiología.** San José - Costa Rica, EUNED, 2004,
p. 46.

31. **GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M., et al.** Tolerance and solubilization of copper by rhizobacteria isolated from sites polluted by potentially toxic elements. *Terra*, vol. 27, n° 1, México DF – México, 2009, p. 17-25

32. **GONZALEZ, S.** Pruebas bioquímicas para Enterobacterias. Chihuahua – Mexico, 2014
<http://es.slideshare.net/SusanaGG/pruebas-bioquimicas>
2015-11-28

33. **GREEN FACTS.** *Hechos sobre la salud y el medio ambiente.*
Barcelona – España, 2015
Disponible en: <http://www.greenfacts.org/es/pcb/>
2015-11-28

34. **GREEN OIL S.A.** *Estudio de Impacto Ambiental Ex - Post Central de Generación Hidroeléctrica de Alao, Descripción del Proceso.* Quito – Ecuador, 2010, pp. 234-240.

35. **GRIBBLE, G.** The Diversity of Naturally Occurring Organohalogen Compounds. *Chemosphere*, vol 15, n° 239, Washington – Estados Unidos de América, 2003, pp. 289-297.
36. **GUALOTO, M.** Biorremediación: Principios y Técnicas.
<http://es.slideshare.net/MiguelGualoto/biorremediacion-14939016>
2016-03-01
37. **HOLLIGER, Christof; WOHLFARTH, Gert; DIEKERT, Gabriele.** Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 22, n° 5, Washington – Estados Unidos de América, 1998, pp. 383-398.
38. **INGLATERRA. BRITANIA LAB.** Productos para cultivo e identificación bacteriana. Londres - Inglaterra. 2011.
<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/simedio.htm>
2015-12-03
39. **LENE, M.** Nutrición, cultivo y crecimiento microbiano. New York – USA, 2012.
<http://es.slideshare.net/biologiaibc/nutricion-cultivo-y-crecimiento-microbiano>.
2015-12-20
40. **LOPERA, E; AGUIRRE, J.** Purificación de aceites aislantes contaminados con Bifenilos Policlorados (PCB's). *SciELO* [en línea], Bogotá – Colombia, vol. 150, n°2, Bogotá – Colombia, 2006, pp. 75-88. [Consulta: 17 enero 2015]. ISSN 0012-7353. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v73n150/a07v73n150.pdf>

41. **MAC FANDDIN, J.** *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica.* Buenos Aires – Argentina, Editorial Médica Panamericana, 2009, p. 235
42. **MACARULLA, J., & GOÑI, F.** *Bioquímica Humana.* Barcelona – España, Reverté S.A, 1994, p. 162
43. **MORAGA, R.; MERINO, C.; MONDACA, M. A.** Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Investigaciones marinas*, vol. 31, nº 1, Santiago – Chile, 2003, p. 91-95.
44. **MORENO, D.** *Morfología de las colonias bacterianas.* Madrid – España, 2009
<https://microdonto.files.wordpress.com/2009/03/morfologia-de-las-colonias-bacterianas.pdf>
2015-12-12
45. **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).** *Polychlorinated biphenyls (PCBs).* [En línea]. 2000. [Consulta: 21 de diciembre del 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/es/>
46. **OROSCO VERDEZOTO, Verónica & SORIA GUANO, Mercedes.** *Biorremediación de vegetación contaminada con petróleo por derrames en el campamento Guarumo - Petroproducción.* Escuela Superior técnica de Chimborazo [En línea] (Tesis Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas, Riobamba – Ecuador, 2008. pp. 47-48. [Consulta: 20 de enero del 2016].
Disponible en: <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/225/1/236T0009.pdf>

47. **OZORES, M.** *Laboratorio de Técnicas Instrumentales UVA* [En línea]. Bogotá – Colombia, 2013, [Consulta: 24 de diciembre del 2015]. Disponible en: <http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografa-de-gases>
48. **PAYNE, Rayford B., et al.** Remediation of polychlorinated biphenyl impacted sediment by concurrent bioaugmentation with anaerobic halorespiring and aerobic degrading bacteria. *Environmental science & technology*, vol. 47, n° 8, Washington – Estados Unidos de América, 2013, pp. 3807-3815.
49. **PIEPER, Dietmar H.** Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls. *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 67, n° 2, Washington – Estados Unidos de América, 2005, p. 170-191.
50. **PIÑALES, Raúl Alberto Poutou; MARTÍNEZ, Eladio Amador; FRONTELA, Maida Candelario.** “Banco de células primario (BCP): Caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes”. *Bioteología Aplicada*, vol. 11, n° 1 Barcelona – España, 1994, p.55-59.
51. **POUTOU, R., AMADOR, E., & CANDELARIO, M.** Banco de células primarias (BCP): Caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes. *Centro de Ingeniería Genética y Bioteología Aplicada*, Barcelona – España, 1994, pp. 55-59.
52. **RAYFORD, K, et al.** Remediation of Polychlorinated Biphenyl Impacted Sediment by Concurrent Bioaugmentation with Anaerobic Halorespiring. *Environmental Science &*

Technology, vol 12, n° 236, Washington – Estados Unidos de América, 2013, pp. 3807–3815.

53. **RECALDE, P., & ZORRILLA, M.** *Evaluación del contenido de Bifenilos Policlorados (PCB's) en los aceites dieléctricos empleados en transformadores de potencia, distribución y servicio en el sector industrial y comercial de la ciudad de Guayaquil.* (Tesis). Universidad De Guayaquil, Facultad De Ingeniería Química, Escuela de Química, Guayaquil – Ecuador, 2008, pp. 32-40.

54. **RODRIGUEZ, E.** *Bacteriología General.* San José - Costa Rica, Universidad de Costa Rica, 2005, pp. 1-2.

55. **SCHEINER, B.J.; et al.** *Biotechnology in minerals and metal processing.* *Society of Mining Engineers.* Littleton – USA: Society for Mining, 1989, p. 209.

56. **SEEGER, Michael; TIMMIS, Kenneth N.; HOFER, Bernd.** Conversion of chlorobiphenyls into phenylhexadienoates and benzoates by the enzymes of the upper pathway for polychlorobiphenyl degradation encoded by the bph locus of *Pseudomonas* sp. strain LB400. *Applied and environmental microbiology*, vol. 61, n° 7, Washington – Estados Unidos de América, 1995, p. 2654-2658.

57. **SERRANO ÁVALOS, Paola.** *Obtención del consorcio bacteriano nativo del sedimento de la laguna de Colta del cantón Colta* [En línea] (Tesis Pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Químicas, Escuela de Ciencias Químicas, Riobamba – Ecuador, 2014, p. 106. [Consulta: 12 de diciembre del 2015]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/3505>

58. **SUECIA. CONVENIO DE ESTOCOLMO.** *Tratamiento de contaminantes orgánicos persistentes (COP's)*. Estocolomo – Suecia, 2001, pp. 13-20
59. **TANDLICH, Roman; BREŽNÁ, Barbara; DERCOVÁ, Katarína.** “The effect of terpenes on the biodegradation of polychlorinated biphenyls by *Pseudomonas stutzeri*”. *Chemosphere*, vol. 44, n° 7, Washington – Estados Unidos de América, 2001, pp. 1547-1555.
60. **WINN, W.** *Diagnóstico Microbiológico*. Madrid - España, Panamericana, 2006, p. 163
61. **WHITE, D: MANUAL DE MANEJO DE PCB'S PARA COLOMBIA.**
Bogotá - Colombia, 2001.
http://www.crc.gov.co/files/Respel/Manual_PCBs.pdf
2016-01-17
62. **WOLF, A. BALBINA, N. & PETER, G.** Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Ecology and industrial microbiology*, vol 15, n° 289, Washington – Estados Unidos de América, 2000, pp. 246–253.
63. **YANG, Y et al.** Degradation of Polychlorinated Biphenyls by Sequential, *Water Air Soil Pollut*, vol 13, n° 345, Washington – Estados Unidos de América, 2015, pp. 226 - 238.

64. **ZHAO, Huimin.** “Directed evolution of novel protein functions”. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 98, n° 2, Washington – Estados Unidos de América, 2007, pp. 313-317.

ANEXOS

ANEXO A. Tabla de propiedades físico químicas de los aceites dieléctricos

PROPIEDAD	UNIDAD	MÉTODO ENSAYO	VALOR USUAL	VALOR LÍMITE
Clase	U: Aceite para transformador no inhibido.			
FUNCIÓN				
Viscosidad a 40 °C	mm ² /s	ISO 3104	10 - 11	< 12
Viscosidad a -30 °C	mm ² /s	ISO 3104	950	< 1800
Punto de congelación	°C	ISO 3016	-45	< -40
Contenido de agua	mg/kg	IEC 60814	< 5 (puesta en servicio)	< 30 (cisterna) < 40 (bidón)
Tensión de ruptura eléctrica	kV	IEC 60156	> 60 (puesta en servicio)	> 30 (suministro)
Densidad a 20°C	g/ml	ISO 3675 o ISO 12185	0,840 – 0,880	< 0,895
Factor de disipación dieléctrica a 90°C		IEC 60247 o IEC 61620	< 0,002	< 0,005
REFINO/ESTABILIDAD				
Aspecto		--	Transparente y brillante	
Acidez	mg KOH/g	IEC 62021-1	<0,01	< 0,01
Tensión interfásica	mN/m	ISO 6295	>40	> 40
Contenido en azufre total		BS 2000 parte 373 o ISO 14596	--	--
Azufre corrosivo		DIN 51353	No corrosivo	
Aditivo antioxidante		IEC 60666	No detectable	
Contenido en 2-furfural	mg/kg	IEC 61198	<0,1	< 0,1
PRESTACIONES				
Estabilidad a la oxidación - Acidez total	mg KOH/g	IEC 61125 (met. C)	0,4	< 1,2
Estabilidad a la oxidación - Lodos	%	IEC 61125 (met. C)	< 0,2 (puesta en servicio)	< 0,8
Estabilidad a la oxidación - Factor de disipación dieléctrica a 90°C		IEC 60247	< 0,05	< 0,5
Formación de gases		IEC 60628, A	--	--
SALUD, SEGURIDAD Y MEDIO AMBIENTE				
Punto de inflamación	°C	ISO 2719	140 -160	> 135
Contenido en PCA	%	BS 2000 parte 346		< 3
Contenido en PCB	%	IEC 61619	No detectable	

Fuente: Electrical Engineering Materials Reference Guide, 1990

ANEXO B. Características Físico Químicas de los PCB's

Parámetro	Característica
Estado físico	Líquido (temperatura ambiente)
Densidad	1,182 – 1,566 g/ml
Solubilidad en agua	Baja, entre $1,08 \times 10^{-5}$ y $9,69 \times 10^{-10}$ mol/litro (generalmente disminuye con la masa molecular relativa ^[9] ^[10])
Solubilidad en aceites y solventes orgánicos	Alta
Solubilidad en lípidos	Rápidamente absorbidos por tejidos grasos
Coefficiente de partición log KOW	4,46 – 8,18 ^[9] ^[10]
Punto de inflamación	Alto (170-380 °C) (no explosivos)
Presión de vapor	Baja (semivolátiles); forman vapores mas pesados que el aire, pero no forman mezclas explosivas con el aire. Generalmente disminuye con la masa molecular relativa y aumenta el grado de sustitución de los cloros en posición orto ^[11] ^[12]
Constantes de la Ley de Henry	$0,3 \times 10^{-4}$ - $8,97 \times 10^{-4}$ atm m ³ /mol (a 25 °C, técnica de purga de gas)determinada para 20 congéneres.
Constante dieléctrica	Alta (baja conductividad eléctrica)
Estabilidad térmica	-Alta resistencia al fuego (pirorresistentes) con temperatura de inflamabilidad elevada (esto es la base de su uso como líquido de enfriamiento en equipos eléctricos). Cuando se calientan pueden producir Dibenzofuranos polidorados, con máxima producción entre los 550 °C y 700 °C. - No cristalizan a bajas temperaturas, pero se transforman en resinas sólidas.
Estabilidad química	Alto grado de estabilidad química bajo condiciones normales. Resistentes a la oxidación, a ácidos, bases y otros agentes químicos. De acuerdo a pruebas de laboratorio, permanecen inalterados químicamente, aun en presencia de oxígeno o algunos metales activos a altas temperaturas (sobre 170 °C) y por periodos prolongados de tiempo.
Impurezas conocidas en mezclas comerciales de PCBs	Dibenzofuranos clorados (en concentraciones de pocos mg/kg y 40 mg/kg), naftalenos clorados y cuaterfenilos clorados.
Color	- PCBs comerciales (mezclas de congéneres) son de color amarillo claro u oscuro - Congéneres individuales son incoloros, a menudo cristalinos

Fuente: Centro de Investigación y Estudios en el Medio Ambiente, 2015

ANEXO C. Tabla para la estimación de UFC/mL según la escala de McFarland

McFARLAND LATEX STANDARDS									
Cat. no. ML05	McFarland Latex Standard #0.5,	One tube/box							
	16x100mm Tube, 8ml								
Cat. no. ML1	McFarland Latex Standard #1,	One tube/box							
	16x100mm Tube, 8ml								
Cat. no. ML2	McFarland Latex Standard #2,	One tube/box							
	16x100mm Tube, 8ml								
Cat. no. ML3	McFarland Latex Standard #3,	One tube/box							
	16x100mm Tube, 8ml								
Cat. no. ML4	McFarland Latex Standard #4,	One tube/box							
	16x100mm Tube, 8ml								
Cat. no. ML5	McFarland Latex Standard #5,	One tube/box							
	16x100mm Tube, 8ml								
Cat. no. ML6	McFarland Latex Standard #6,	One tube/box							
	16x100mm Tube, 8ml								
Cat. no. ML7	McFarland Latex Standard #7,	One tube/box							
	16x100mm Tube, 8ml								
Cat. no. ML8	McFarland Latex Standard #8,	One tube/box							
	16x100mm Tube, 8ml								

STORAGE AND SHELF LIFE									
Storage: Upon receipt store at 2-30 degrees C. These products are ready for use and no further preparation is necessary. These products should be stored in their original container. Do not freeze or overheat. Do not incubate prior to use. Standards should not be used if there are any signs of deterioration, contamination, color change or if the expiration date has passed.									
The expiration date applies to the product in its intact packaging when stored as directed.									
These products, depending on the formula, have the following shelf life from the date of manufacture: (sold individually)									
540 Days:		ML05 through ML8 McFarland Latex Standards							

PRECAUTIONS									
These products are for <i>in vitro</i> diagnostic use only and are to be used only by adequately trained and qualified laboratory personnel. Observe approved biohazard precautions and aseptic techniques. All laboratory specimens should be considered infectious and handled according to "standard precautions". The "Guideline for Isolation Precautions" is available from the Centers of Disease Control and Prevention at www.cdc.gov/ncidod/dhqp/gl_isolation.html .									
For additional information regarding specific precautions for the prevention of the transmission of all infectious agents from laboratory instruments and materials, and for recommendations for the management of exposure to infectious disease, refer to CLSI document M29: <i>Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline</i> .									
Sterilize all biohazard waste before disposal.									
Do not open cap. Cap should remain tightly closed at all times. Observe all safety precautions consistent with the hazard(s) stated on the Material Safety Data Sheet. Avoid contact with skin and eyes. Do not ingest.									
Refer to the keyword "MSDS", in the Hardy Diagnostics' software program HUGO™, for more information on handling potentially hazardous material.									

PROCEDURE									
Specimen Collection: Not applicable since these standards are used for the standardization of inoculum for susceptibility testing. Isolation techniques and tests for purity are necessary. Information on specimen collection may be found in standard reference texts.									
Method of Use:									
1. Mix the standard to fully suspend the particles. Gently mix the McFarland Latex Standards (ML05-ML8) by inverting - Do not vortex the latex standards.									
2. Adjust the turbidity of an actively growing broth culture or bacterial suspension of colonies selected from an 18-24 hour agar plate to obtain a turbidity visually comparable to that of the desired standard. The tubes for the suspension should be the same diameter as the McFarland Latex Standard tube.									



INTENDED USE									
McFarland Latex Standards are used as turbidity standards for adjusting densities of bacterial suspensions.									

SUMMARY									
McFarland Standards provide a reference for standardization of bacterial suspensions used for susceptibility testing and other procedures that require a standardized inoculum. Original McFarland Standards were prepared by adding barium chloride to sulfuric acid resulting in a barium sulfate precipitation. ⁽⁴⁾ CLSI now accepts the use of latex particle suspension turbidity standards for the preparation of standardized bacterial suspensions. ⁽⁸⁾									
The McFarland Latex Standards (Cat. no. ML05-ML8) are prepared from suspensions of uniform latex particles with similar absorbance values as the original barium sulfate standards. The latex standards are prepared by suspending latex particles in a buffer solution. Sodium azide is added as a preservative. The standards are adjusted to an acceptable absorbance range with a one centimeter light path set at 625nm. Adjusting the bacterial suspension turbidity to a McFarland Standard produces bacterial counts in an expected range. As with the barium sulfate standards, a 0.5 McFarland Latex Standard is comparable to a bacterial suspension of 1.5 X 10 ⁸ CFU/ml.									
The stability of McFarland Latex Standards allows for a significantly longer shelf-life than the original barium sulfate standards due to reduced light sensitivity.									

FORMULA									
Latex Standard	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8
Latex Particles									
Sodium Azide									
Approximate Cell Density x 10 ⁷ /ml	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24
Absorbance	0.08	0.14	0.27	0.38	0.51	0.67	0.74	0.83	0.94
Specification at 625nm (ABS)	to 0.10	to 0.17	to 0.31	to 0.42	to 0.55	to 0.70	to 0.77	to 0.88	to 0.98

Fuente: Clinical and Laboratory Standard Intitute, 2015.

ANEXO D. Resultados del análisis de PCB's del aceite dieléctrico utilizado para el experimento *in vitro*

 <p>CESTTA SGC</p>	<p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>DEPARTAMENTO : LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN (LABCESTTA)</p> <p>Panamericana Sur Km. 1 ½, ESPOCH (Facultad de Ciencias) RIOBAMBA - ECUADOR Telefax: (03) 3013183</p>	 <p>Servicio de Acreditación Ecuatoriano</p> <p>Acreditación N° OAE LE 2C 06-008 LABORATORIO DE ENSAYOS</p>
--	--	--

<p>INFORME DE ENSAYO No: 112</p> <p>ST: 010-16 ANÁLISIS DE QUÍMICOS</p> <p>Nombre Peticionario: NA</p> <p>Atn. Dra. Nancy Veloz</p> <p>Dirección: Panamericana sur km 1 ½ Riobamba - Chimborazo</p>	
<p>FECHA: 02 de Febrero del 2016</p> <p>NUMERO DE MUESTRAS: 1</p> <p>FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2016/01/28 - 12:30</p> <p>FECHA DE MUESTREO: 2016/01/28 - 11:00</p> <p>FECHA DE ANÁLISIS: 2016/01/28 - 2016/02/02</p> <p>TIPO DE MUESTRA: Aceite dieléctrico</p> <p>CÓDIGO LABCESTTA: LAB-Q 102-16</p> <p>CÓDIGO DE LA EMPRESA: NA</p> <p>PUNTO DE MUESTREO: Transformador Central Hidroeléctrica Alao</p> <p>ANÁLISIS SOLICITADO: Químico</p> <p>PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Carmen Yambay</p> <p>CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS: T máx.: 25.0 °C. T mín.: 15.0 °C</p>	

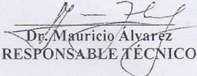
RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	INCERTIDUMBRE (k=2)	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)
Aroclor 1242	PEE/LABCESTTA/232 ASTM-D 4059	mg/kg	<10	±27%	50
Aroclor 1254	PEE/LABCESTTA/232 ASTM-D 4059	mg/kg	13,54	±22%	50
Aroclor 1260	PEE/LABCESTTA/232 ASTM-D 4059	mg/kg	<10	±25%	50
*PCBs Total	PEE/LABCESTTA/232 ASTM-D 4059	mg/kg	13,54	-	50

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.
- Los parámetros marcados con (*) no se encuentran dentro del alcance de acreditación del SAE.
- La columna marcada con (■) corresponde al límite máximo permisible establecido en el Convenio de Estocolmo. Solicitados por el cliente.

RESPONSABLE DEL INFORME:



Dr. Mauricio Alvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL
E INSPECCIÓN
LAB - CESTTA
ESPOCH

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio. Los resultados arriba indicados sólo están relacionados con los objetos ensayados
MIC01-14

Página 1 de 1
Edición 5

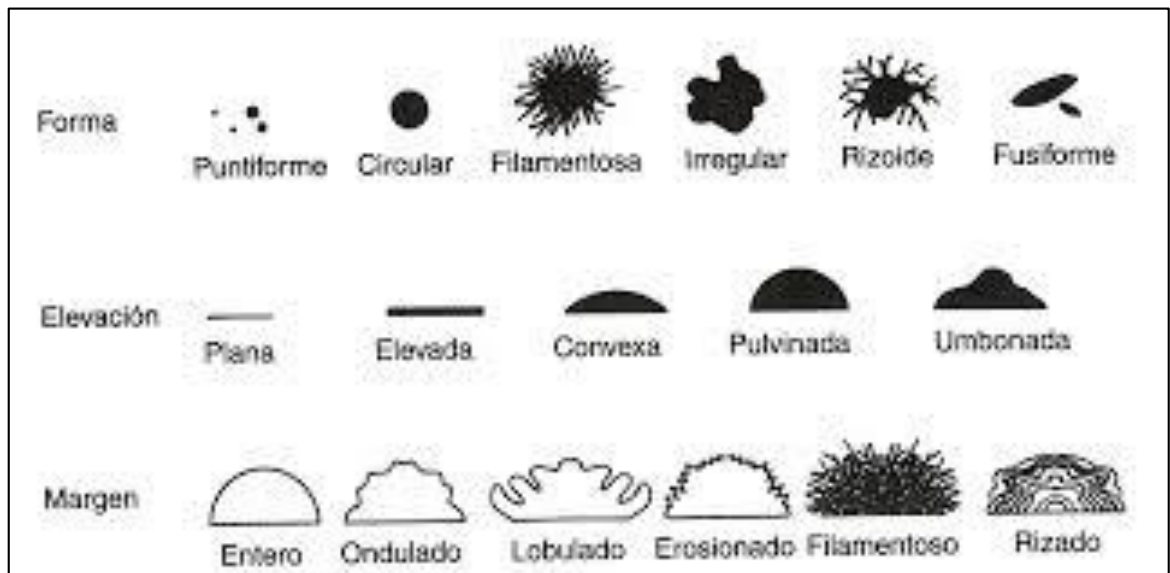
Fuente: Lab CESTTA, 2015.

ANEXO E. Cálculo del número de colonias según la INEN

Fecha siembra		13/10/2015									
Temperatura		30°C									
Medio	Serie Duplicada	Número de colonias (UFC) para 10⁻²						Promedio UFC	Área caja(cm)	N°.colonias	UFC/mL
		Cuadro 1	Cuadro 2	Cuadro 3	Cuadro 4	Cuadro 5					
PAS	A	72	80	40	30	64	57	65	3718	148720	
	B	68	74	52	40	70	61	65	3952	158080	
Número de colonias (UFC) para 10⁻²											
Mm	A	18	53	13	21	15	24	65	1560	62400	
	B	16	62	10	30	8	25	65	1638	65520	
Número de colonias (UFC) para 10⁻²											
Mm + Aceite	A	30	42	45	23	23	33	65	2119	84760	
	B	21	49	36	43	12	32	65	2093	83720	
Número de colonias (UFC) para 10⁻³											
Mm + Aceite	A	7	5	1	4	2	4	65	247	9880	
	B	5	1	4	5	3	4	65	234	9360	

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2016

ANEXO F. Guía para determinar la morfología de las colonias bacterianas



Fuente: Microbiologiaitt, 2015

ANEXO G. Temperatura promedio de la ciudad de Riobamba durante los meses de investigación en laboratorio

	MES DEL AÑO 2015	TEMPERATURA MÍNIMA (°C)	TEMPERATURA MÁXIMA (°C)	TEMPERATURA MEDIA (°C)
Media	Octubre	9,7	22,0	14,0
	Noviembre	9,8	21,5	14,0
	Diciembre	9,2	21,9	14,0
Máxima (24 horas)	Octubre	15,2	25,4	11,2
	Noviembre	12,0	25,0	15,7
	Diciembre	11,8	24,6	15,8
Mínima (24 horas)	Octubre	3,4	18,4	12,2
	Noviembre	4,8	14,6	11,5
	Diciembre	2,6	18,3	12,2

Fuente: Estación Agrometeorológica, Facultad de Recursos Naturales, ESPOCH.

Realizado por: ARELLANO, Diana & YAMBAY, Carmen, 2015

ANEXO H. Tabla de resultados de las pruebas bioquímicas para identificación de especies del género *Pseudomonas*

TABLA 37: CARACTERÍSTICAS DEL GENERO <i>PSEUDOMONAS</i>	
Morfología	Bacilos rectos o ligeramente curvados.
Reacción frente a la coloración de Gram	Negativa.
Formación de esporas	Gramnegativa.
Requerimiento de oxígeno	Aerobio estricto (1).
O-F glucosa	Oxidativo o inerte.
Oxidasa	Positiva (2).
Catalasa	Positiva.
Movilidad	Positiva (3).
Reducción de nitrato	Variable.
Indol	Negativo.
Rojo de metilo	Negativo.
Voges Proskauer	Negativo.
Crecimiento en agar MacConkey	Positivo (4).

TABLA 38: CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE LAS PRINCIPALES ESPECIES DE <i>PSEUDOMONAS</i>																	
	Piocianina	Pioverdina	Crecimiento a 42°C	O-F glucosa	Ondasa	Movilidad	Lisina decarboxilasa	Omitina decarboxilasa	Arginina dihidrolasa	Ureasa	Hidrolasa gelatina	Gluconato	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Fructosa	Mentol
<i>P. aeruginosa</i>	+	√+	+	O	+	+	-	-	+	√	+	+	+	-	√	√+	√
<i>P. putida</i>	+	√+	-	O	+	+	-	-	+	√	+	+	+	-	√	√	√
<i>P. fluorescens</i>	-	+	-	O	+	+	-	-	+	√	+	+	+	-	√	√	√
<i>P. maltophilia</i>	-	+	-	O	+	+	-	-	+	√	+	+	+	-	√	√	√
<i>P. alcaligenes</i>	-	-	-	O	+	+	-	-	+	√	+	+	+	-	√	√	√
<i>P. pseudocalcigenes</i>	-	-	-	O	+	+	-	-	+	√	+	+	+	-	√	√	√
<i>P. pseudomallei</i>	-	-	+	O	+	+	-	-	+	√	+	+	+	-	√	√	√
<i>P. mallei</i>	-	-	+	O	+	+	-	-	+	√	+	+	+	-	√	√	√
<i>P. cepacia</i>	-	-	-	O	+	+	-	-	+	√	+	+	+	-	√	√	√
<i>P. putrefaciens</i>	-	-	-	O	+	+	-	-	+	√	+	+	+	-	√	√	√
<i>P. testosteroni</i>	-	-	-	O	+	+	-	-	+	√	+	+	+	-	√	√	√
<i>P. acidovorans</i>	-	-	-	O	+	+	-	-	+	√	+	+	+	-	√	√	√
<i>P. vesicularis</i>	-	-	-	O	+	+	-	-	+	√	+	+	+	-	√	√	√
<i>P. diminuta</i>	-	-	-	O	+	+	-	-	+	√	+	+	+	-	√	√	√
<i>P. stutzeri</i>	-	-	-	O	+	+	-	-	+	√	+	+	+	-	√	√	√
<i>P. mendocina</i>	-	-	+	O	+	+	-	-	+	√	+	+	+	-	√	√	√

- Algunas cepas utilizan el oxígeno del nitrato como aceptor alternativo de electrones y crecen anaeróbicamente.
- Excepto *P. maltophilia* y algunas cepas de *P. mallei*, que son negativas.
- Excepto *P. mallei*, que es negativo.
- Excepto *P. vesicularis*, que es variable negativo.

- Algunas cepas no producen piocianina.
- Algunas cepas oxidan la glucosa.
- La reacción puede ser débil.
- La reacción en caso positivo puede ser débil.
- La reacción en caso positivo suele ser débil.

Fuente: ALVAREZ & BOQUET, 2002


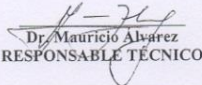
ANEXO I. Tabla de resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de especies de la familia *Enterobacteriaceae*

TABLA 36: CARACTERISTICAS PARA LA DIFERENCIACION DE LAS ESPECIES DE LA FAMILIA *ENTEROBACTERIACEAE**


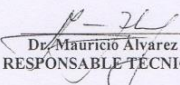
	Adonitol	Arabinosa	Arginina dehidrolasa	Citrato	Crecimiento en KCN	DNasa	Fenilalanina desaminasa	Gas de glucosa	Indol	Inositol	Lactosa	Lisina decarboxilasa	Malonato	Manitol	Mejlobiosa	Movilidad	ONPG	Omitina decarboxilasa	Rafinosa	Ramnosa	Sacarosa	Salicina	Sorbitol	St ₂	Trehalosa	Ureasa	Voges Proskauer	Xilosa
<i>Escherichia coli</i>	-	+	V ⁻	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	V ⁺	V ⁺	+	V ⁻	V ⁻	V ⁺	V ⁻	V ⁻	V ⁺	-	+	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> inactivo	-	+	V ⁻	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	V ⁺	V ⁺	+	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁺	-	+	-	-	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	V ⁻	-	-	-	-	-	-	V ⁻	-	-	-	-	-	-	-	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁻	-	+	-	-	V ⁻
<i>Shigella flexneri</i>	-	V ⁻	-	-	-	-	-	-	V ⁻	-	-	-	-	+	V ⁻	-	-	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁻	-	V ⁺	-	-	-
<i>Shigella boydii</i>	-	+	V ⁻	-	-	-	-	-	V ⁻	-	-	-	-	+	V ⁻	-	-	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁻	-	V ⁺	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	V ⁻	-	-	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁻	-	V ⁺	-	-	V ⁻
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>Klebsiella ozaenae</i> (1)	+	+	-	V ⁻	V ⁺	-	-	V ⁻	-	V ⁻	V ⁻	V ⁻	-	+	+	-	V ⁺	-	+	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁺	-	+	+	V ⁻	+
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i> (1)	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	V ⁺	+	V ⁺	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	V ⁺	+	V ⁺	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	V ⁻	+	+	+	+	-	-	+	-	V ⁻	+	-	V ⁺	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	V ⁺	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	V ⁺	+	+
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	+	-	V ⁻	V ⁻	-	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁻	V ⁺	+	V ⁻	+	+	V ⁻	V ⁺	V ⁺	V ⁺	V ⁺	V ⁻	-	+	-	+	+
<i>Enterobacter gergoviae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	V ⁺	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V ⁻	-	+	V ⁻	V ⁺	+
<i>Enterobacter sakazakii</i>	-	+	+	+	+	-	V ⁻	+	V ⁺	+	+	-	V ⁻	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	V ⁻	-	-	+	+	+	-	V ⁻	-	V ⁻	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	V ⁻	+	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	+	-	+	+	V ⁺	-	V ⁻	-	V ⁻	V ⁻	V ⁺	-	+	V ⁺	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>Serratia rubidaea</i>	+	+	-	+	V ⁺	+	-	V ⁻	+	V ⁻	+	V ⁺	+	+	+	+	+	+	V ⁺	V ⁻	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>Morganella morganii</i>	-	-	-	-	+	-	+	V ⁺	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	V ⁺	+	-	+	V ⁺	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	V ⁻	+	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	V ⁻	+	V ⁺	+	V ⁺	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	V ⁻	-	-	+	+	+	V ⁻	+
<i>Providencia alcalifaciens</i>	+	-	-	+	+	-	+	V ⁺	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	V ⁻	-	-	-	-	-	-	-
<i>Providencia rettgeri</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	V ⁺	V ⁻	V ⁻	-	-	-	-	-	-
<i>Providencia stuartii</i>	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	V ⁻	-	-	-	+	V ⁻	-	-

Fuente: (Alvarez y Boquet, 2002)


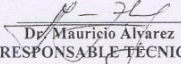
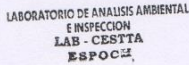
ANEXO J. Resultados del análisis de PCB's en el grupo control (arena más aceite) en el tiempo 0, utilizado para el experimento *in vitro*

 <p>CESTTA SGC</p>	<p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>DEPARTAMENTO : LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN (LABCESTTA)</p> <p>Panamericana Sur Km. 1 ½, ESPOCH (Facultad de Ciencias) RIOBAMBA - ECUADOR Telefax: (03) 3013183</p>																									
<p>INFORME DE ENSAYO No: 1881 ST: 107- 015 ANÁLISIS DE SUELOS Nombre Peticionario: NA Atn. Dra. Nancy Veloz Dirección: Panamericana sur Km 1 ½ Riobamba-Chimborazo</p> <p>FECHA: 28 de Diciembre del 2015 NUMERO DE MUESTRAS: 1 FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2015/12/15 - 10:25 FECHA DE MUESTREO: 2015/12/15 - 09:00 FECHA DE ANÁLISIS: 2015/12/15 - 2015/12/28 TIPO DE MUESTRA: Arena CÓDIGO LABCESTTA: LAB-S 279-15 G_c CÓDIGO DE LA EMPRESA: G PUNTO DE MUESTREO: Laboratorio microbiología facultad de ciencias ANÁLISIS SOLICITADO: Físico- Químico PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Carmen Yambay CONDICIONES AMBIENTALES: T máx.:25.0 °C. T min.: 15.0 °C</p>	<p>RESULTADOS ANALÍTICOS:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>PARÁMETROS</th> <th>MÉTODO /NORMA</th> <th>UNIDAD</th> <th>RESULTADO</th> <th>VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Aroclor 1242</td> <td>Cromatografía de Gases/ECD</td> <td>mg/kg</td> <td>< 0,01</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Aroclor 1254</td> <td>Cromatografía de Gases/ECD</td> <td>mg/kg</td> <td>0,75</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Aroclor 1260</td> <td>Cromatografía de Gases/ECD</td> <td>mg/kg</td> <td>< 0,01</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>PCB's Total</td> <td>Cromatografía de Gases/ECD</td> <td>mg/kg</td> <td>0,75</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>	PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)	Aroclor 1242	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	< 0,01	-	Aroclor 1254	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	0,75	-	Aroclor 1260	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	< 0,01	-	PCB's Total	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	0,75	-
PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)																						
Aroclor 1242	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	< 0,01	-																						
Aroclor 1254	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	0,75	-																						
Aroclor 1260	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	< 0,01	-																						
PCB's Total	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	0,75	-																						
<p>OBSERVACIONES:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Muestra receptada en el laboratorio. <p>RESPONSABLE DEL INFORME:</p> <div style="text-align: center;">  <p>Dr. Mauricio Álvarez RESPONSABLE TÉCNICO</p> <p>LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN LAB - CESTTA ESPOCH</p> </div>																										
<p>Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio. Los resultados arriba indicados sólo están relacionados con los objetos ensayados</p> <p>MC01-16</p>																										
<p>Página 1 de 1 Edición 3</p>																										


ANEXO K. Resultados del análisis de PCB's en la Unidad Experimental A en el tiempo 0 del experimento *in vitro*

 <p>CESTTA SGC</p>	<p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>DEPARTAMENTO : LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN (LABCESTTA)</p> <p>Panamericana Sur Km. 1 ½, ESPOCH (Facultad de Ciencias) RIOBAMBA - ECUADOR Telefax: (03) 3013183</p>																									
<p>INFORME DE ENSAYO No: 1881 ST: 107-015 ANÁLISIS DE SUELOS Nombre Peticionario: NA Atn. Dra. Nancy Veloz Dirección: Panamericana sur Km 1 ½ Riobamba-Chimborazo</p>																										
<p>FECHA: 28 de Diciembre del 2015 NUMERO DE MUESTRAS: 1 FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2015/12/15 - 10:25 FECHA DE MUESTREO: 2015/12/15 - 09:00 FECHA DE ANÁLISIS: 2015/12/15 - 2015/12/28 TIPO DE MUESTRA: Arena CÓDIGO LABCESTTA: LAB-S 278-15 <i>Ac</i> CÓDIGO DE LA EMPRESA: AO PUNTO DE MUESTREO: Laboratorio microbiología facultad de ciencias ANÁLISIS SOLICITADO: Físico- Químico PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Carmen Yambay CONDICIONES AMBIENTALES: T máx.:25.0 °C. T mín.: 15.0 °C</p>																										
<p>RESULTADOS ANALÍTICOS:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>PARÁMETROS</th> <th>MÉTODO /NORMA</th> <th>UNIDAD</th> <th>RESULTADO</th> <th>VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Aroclor 1242</td> <td>Cromatografía de Gases/ECD</td> <td>mg/kg</td> <td>< 0,01</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Aroclor 1254</td> <td>Cromatografía de Gases/ECD</td> <td>mg/kg</td> <td>0,97</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Aroclor 1260</td> <td>Cromatografía de Gases/ECD</td> <td>mg/kg</td> <td>< 0,01</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>PCB's Total</td> <td>Cromatografía de Gases/ECD</td> <td>mg/kg</td> <td>0,97</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>		PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)	Aroclor 1242	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	< 0,01	-	Aroclor 1254	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	0,97	-	Aroclor 1260	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	< 0,01	-	PCB's Total	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	0,97	-
PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)																						
Aroclor 1242	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	< 0,01	-																						
Aroclor 1254	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	0,97	-																						
Aroclor 1260	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	< 0,01	-																						
PCB's Total	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	0,97	-																						
<p>OBSERVACIONES:</p> <ul style="list-style-type: none"> Muestra receptada en el laboratorio. 																										
<p>RESPONSABLE DEL INFORME:</p> <div style="text-align: center;">  <p>Dr. Mauricio Alvarez RESPONSABLE TÉCNICO</p> <p>LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN LAB - CESTTA ESPOCH</p> </div>																										
<p>Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio. Los resultados arriba indicados sólo están relacionados con los objetos ensayados MC01-16</p>																										
<p>Página 1 de 1 Edición 3</p>																										

**ANEXO L. Resultados del análisis de PCB's en la Unidad Experimental B en el tiempo
0 del experimento *in vitro***

 <p>CESTTA SGC</p>	<p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>DEPARTAMENTO : LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN (LABCESTTA)</p> <p>Panamericana Sur Km. 1 ½, ESPOCH (Facultad de Ciencias) RIOBAMBA - ECUADOR Telefax: (03) 3013183</p>																												
<p>INFORME DE ENSAYO No: 1881 ST: 107- 015 ANÁLISIS DE SUELOS Nombre Peticionario: NA Atn. Dra. Nancy Veloz Dirección: Panamericana sur Km 1 ½ Riobamba-Chimborazo</p> <p>FECHA: 28 de Diciembre del 2015 NUMERO DE MUESTRAS: 1 FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2015/12/15 - 10:25 FECHA DE MUESTREO: 2015/12/15 - 09:00 FECHA DE ANÁLISIS: 2015/12/15 - 2015/12/28 TIPO DE MUESTRA: Arena CÓDIGO LABCESTTA: LAB-S 277-15 <i>B₀</i> CÓDIGO DE LA EMPRESA: BO PUNTO DE MUESTREO: Laboratorio microbiología facultad de ciencias ANÁLISIS SOLICITADO: Físico- Químico PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Carmen Yambay CONDICIONES AMBIENTALES: T máx.:25.0 °C. T min.: 15.0 °C</p>																													
RESULTADOS ANALÍTICOS:																													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>PARÁMETROS</th> <th>MÉTODO /NORMA</th> <th>UNIDAD</th> <th>RESULTADO</th> <th>VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td align="center">Aroclor 1242</td> <td align="center">Cromatografía de Gases/ECD</td> <td align="center">mg/kg</td> <td align="center">< 0,01</td> <td align="center">-</td> </tr> <tr> <td align="center">Aroclor 1254</td> <td align="center">Cromatografía de Gases/ECD</td> <td align="center">mg/kg</td> <td align="center">0,84</td> <td align="center">-</td> </tr> <tr> <td align="center">Aroclor 1260</td> <td align="center">Cromatografía de Gases/ECD</td> <td align="center">mg/kg</td> <td align="center">< 0,01</td> <td align="center">-</td> </tr> <tr> <td align="center">PCB's Total</td> <td align="center">Cromatografía de Gases/ECD</td> <td align="center">mg/kg</td> <td align="center">0,84</td> <td align="center">-</td> </tr> </tbody> </table>					PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)	Aroclor 1242	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	< 0,01	-	Aroclor 1254	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	0,84	-	Aroclor 1260	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	< 0,01	-	PCB's Total	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	0,84	-
PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)																									
Aroclor 1242	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	< 0,01	-																									
Aroclor 1254	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	0,84	-																									
Aroclor 1260	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	< 0,01	-																									
PCB's Total	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	0,84	-																									
OBSERVACIONES:																													
<ul style="list-style-type: none"> • Muestra receptada en el laboratorio. 																													
RESPONSABLE DEL INFORME:																													
 Dr. Mauricio Alvarez RESPONSABLE TÉCNICO																													
																													
<p>Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio. Los resultados arriba indicados sólo están relacionados con los objetos ensayados MC01-16</p>																													
<p>Página 1 de 1 Edición 3</p>																													

ANEXO M. Resultados del análisis de PCB's en la Unidad Experimental C en el tiempo 0 del experimento *in vitro*

 <p>CESTTA SGC</p>	<p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>DEPARTAMENTO : LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN (LABCESTTA)</p> <p>Panamericana Sur Km. 1 ½, ESPOCH (Facultad de Ciencias) RIOBAMBA - ECUADOR Telefax: (03) 3013183</p>
--	--

INFORME DE ENSAYO No: 1881 ST: 107-015 ANÁLISIS DE SUELOS Nombre Peticionario: NA Atn. Dra. Nancy Veloz Dirección: Panamericana sur Km 1 ½ Riobamba-Chimborazo	
FECHA: 28 de Diciembre del 2015 NUMERO DE MUESTRAS: 1 FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2015/12/15 - 10:25 FECHA DE MUESTREO: 2015/12/15 - 09:00 FECHA DE ANÁLISIS: 2015/12/15 - 2015/12/28 TIPO DE MUESTRA: Arena CÓDIGO LABCESTTA: LAB-S 276-15 <i>Co</i> CÓDIGO DE LA EMPRESA: CO PUNTO DE MUESTREO: Laboratorio microbiología facultad de ciencias ANÁLISIS SOLICITADO: Físico- Químico PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Carmen Yambay CONDICIONES AMBIENTALES: T máx.:25.0 °C. T mín.: 15.0 °C	

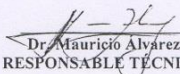
RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)
Aroclor 1242	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	< 0,01	-
Aroclor 1254	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	0,75	-
Aroclor 1260	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	< 0,01	-
PCB's Total	Cromatografía de Gases/ECD	mg/kg	0,75	-

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.

RESPONSABLE DEL INFORME:




Dr. Mauricio Alvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

LABORATORIO DE ANALISIS AMBIENTAL
E INSPECCION
LAB - CESTTA
ESPOCH

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.
Los resultados arriba indicados sólo están relacionados con los objetos ensayados
MC01-16

Página 1 de 1
Edición 3

ANEXO N. Resultados del análisis de PCB's en el grupo control (arena más aceite) a los 42 días, utilizado para el experimento *in vitro*

	CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL
	DEPARTAMENTO : LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN (LABCESTTA) Panamericana Sur Km. 1 ½, ESPOCH (Facultad de Ciencias) RIOBAMBA - ECUADOR Telefax: (03) 3013183

INFORME DE ENSAYO No:	27
ST:	01- 16 ANÁLISIS DE SUELOS
Nombre Peticionario:	NA
Atn.	Dra. Nancy Veloz
Dirección:	Panamericana sur Km 1 ½ Riobamba-Chimborazo
FECHA:	20 de Enero del 2016
NUMERO DE MUESTRAS:	1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:	2016/01/08 - 10:38
FECHA DE MUESTREO:	2016/01/07 - 14:00
FECHA DE ANÁLISIS:	2016/01/08 - 2016/01/20
TIPO DE MUESTRA:	Arena
CÓDIGO LABCESTTA:	LAB-S 04-16 G30
CÓDIGO DE LA EMPRESA:	G1
PUNTO DE MUESTREO:	Laboratorio microbiología facultad de ciencias
ANÁLISIS SOLICITADO:	Físico- Químico
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:	Diana Arellano
CONDICIONES AMBIENTALES:	T máx.:25.0 °C. T min.: 15.0 °C

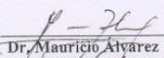
RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)
Aroclor 1242	Cromatografía de Gases	mg/kg	< 0,01	-
Aroclor 1254	Cromatografía de Gases	mg/kg	0,79	-
Aroclor 1260	Cromatografía de Gases	mg/kg	< 0,01	-
PCB's Total	Cromatografía de Gases	mg/kg	0,79	-

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.

RESPONSABLE DEL INFORME:


 Dr. Mauricio Álvarez
 RESPONSABLE TÉCNICO

LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL
 E INSPECCIÓN
 LAB - CESTTA
 ESPOCH

ANEXO O. Resultados del análisis de PCB's en la Unidad Experimental A a los 42 días del experimento *in vitro*



**CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y
TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL**

DEPARTAMENTO :
**LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN
(LABCESTTA)**

Panamericana Sur Km. 1 ½, ESPOCH (Facultad de Ciencias)
RIOBAMBA - ECUADOR
Telefax: (03) 3013183

INFORME DE ENSAYO No: 27
ST: 01- 16 ANÁLISIS DE SUELOS
Nombre Peticionario: NA
Atn. Dra. Nancy Veloz
Dirección: Panamericana sur Km 1 ½
Riobamba-Chimborazo

FECHA: 20 de Enero del 2016
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2016/01/08 - 10:38
FECHA DE MUESTREO: 2016/01/07 - 14:00
FECHA DE ANÁLISIS: 2016/01/08 - 2016/01/20
TIPO DE MUESTRA: Arena
CÓDIGO LABCESTTA: LAB-S 03-16 A30
CÓDIGO DE LA EMPRESA: A30
PUNTO DE MUESTREO: Laboratorio microbiología facultad de ciencias
ANÁLISIS SOLICITADO: Físico- Químico
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Diana Arellano
CONDICIONES AMBIENTALES: T máx.:25.0 °C. T mín.: 15.0 °C

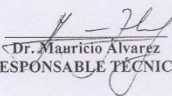
RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)
Aroclor 1242	Cromatografía de Gases	mg/kg	< 0,01	-
Aroclor 1254	Cromatografía de Gases	mg/kg	0,65	-
Aroclor 1260	Cromatografía de Gases	mg/kg	< 0,01	-
PCB's Total	Cromatografía de Gases	mg/kg	0,65	-

OBSERVACIONES:


- Muestra receptada en el laboratorio.

RESPONSABLE DEL INFORME:


Dr. Mauricio Alvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

 LABORATORIO DE ANALISIS AMBIENTAL
 E INSPECCION
LAB - CESTTA
ESPOCH

ANEXO P. Resultados del análisis de PCB's en la Unidad Experimental B a los 42 días del experimento *in vitro*

 <p>CESTTA SGC</p>	<p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>DEPARTAMENTO : LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN (LABCESTTA)</p> <p>Panamericana Sur Km. 1 ½, ESPOCH (Facultad de Ciencias) RIOBAMBA - ECUADOR Telefax: (03) 3013183</p>
--	--

INFORME DE ENSAYO No: ST: Nombre Peticionario: Atn. Dirección:	27 01- 16 ANÁLISIS DE SUELOS NA Dra. Nancy Veloz Panamericana sur Km 1 ½ Riobamba-Chimborazo
FECHA: NUMERO DE MUESTRAS: FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: FECHA DE MUESTREO: FECHA DE ANÁLISIS: TIPO DE MUESTRA: CÓDIGO LABCESTTA: CÓDIGO DE LA EMPRESA: PUNTO DE MUESTREO: ANÁLISIS SOLICITADO: PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: CONDICIONES AMBIENTALES:	20 de Enero del 2016 1 2016/01/08 - 10:38 2016/01/07 - 14:00 2016/01/08 - 2016/01/20 Arena LAB-S 02-16 B30 B30 Laboratorio microbiología facultad de ciencias Físico- Químico Diana Arellano T máx.:25.0 °C. T mín.: 15.0 °C

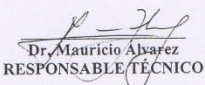
RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)
Aroclor 1242	Cromatografía de Gases	mg/kg	< 0,01	-
Aroclor 1254	Cromatografía de Gases	mg/kg	0,62	-
Aroclor 1260	Cromatografía de Gases	mg/kg	< 0,01	-
PCB's Total	Cromatografía de Gases	mg/kg	0,62	-

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.

RESPONSABLE DEL INFORME:



Dr. Mauricio Alvarez
RESPONSABLE TÉCNICO


LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL
E INSPECCIÓN
LAB - CESTTA
ESPOCH

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.
Los resultados arriba indicados sólo están relacionados con los objetos ensayados

MC01-16

Página 1 de 1
 Edición 3

ANEXO Q. Resultados del análisis de PCB's en la Unidad Experimental C a los 42 días del experimento *in vitro*

 <p>CESTTA SGC</p>	<p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>DEPARTAMENTO : LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN (LABCESTTA)</p> <p>Panamericana Sur Km. 1 ½, ESPOCH (Facultad de Ciencias) RIOBAMBA - ECUADOR Telefax: (03) 3013183</p>
--	--

<p>INFORME DE ENSAYO No: 27 ST: 01- 16 ANÁLISIS DE SUELOS Nombre Peticionario: NA Atn. Dra. Nancy Veloz Dirección: Panamericana sur Km 1 ½ Riobamba-Chimborazo</p> <p>FECHA: 20 de Enero del 2016 NUMERO DE MUESTRAS: 1 FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2016/01/08 - 10:38 2016/01/07 - 14:00 FECHA DE MUESTREO: 2016/01/08 - 2016/01/20 FECHA DE ANÁLISIS: Arena TIPO DE MUESTRA: LAB-S 01-16 C₃₀ CÓDIGO LABCESTTA: C30 CÓDIGO DE LA EMPRESA: Laboratorio microbiología facultad de ciencias PUNTO DE MUESTREO: Físico- Químico ANÁLISIS SOLICITADO: Diana Arellano PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: T máx.:25.0 °C. T mín.: 15.0 °C CONDICIONES AMBIENTALES:</p>	
---	--

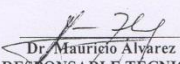
RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)
Aroclor 1242	Cromatografía de Gases	mg/kg	< 0,01	-
Aroclor 1254	Cromatografía de Gases	mg/kg	0,66	-
Aroclor 1260	Cromatografía de Gases	mg/kg	< 0,01	-
PCB's Total	Cromatografía de Gases	mg/kg	0,66	-

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.

RESPONSABLE DEL INFORME:


Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

LABORATORIO DE ANALISIS AMBIENTAL
E INSPECCION
LAB - CESTTA
ESPOCH

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio. Los resultados arriba indicados sólo están relacionados con los objetos ensayados MC01-16	Página 1 de 1 Edición 3
---	----------------------------

Fuente: Lab CESTTA, 2016