



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“BIORREMEDIACIÓN DE LOS SUELOS CONTAMINADOS
CON HIDROCARBUROS PROVENIENTES DE LA ESTACIÓN
DE SECOYA UTILIZANDO UN CONSORCIO BACTERIANO
AEROBIO A ESCALA DE LABORATORIO.”**

TRABAJO DE TITULACIÓN
TIPO: Proyecto de Investigación

Presentado para optar el grado académico de:

INGENIERA QUÍMICA

AUTORA: ERIKA PAOLA RODRÍGUEZ OCHOA
DIRECTOR: ING. MARIO GUSTAVO VILLACRÉS ÁLVAREZ

Riobamba – Ecuador

2018

©2018, Erika Paola Rodríguez Ochoa

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 INGENIERÍA QUÍMICA

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación: Tipo: Proyecto de Investigación “**BIORREMEDIACIÓN DE LOS SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS PROVENIENTES DE LA ESTACIÓN DE SECOYA UTILIZANDO UN CONSORCIO BACTERIANO AEROBIO A ESCALA DE LABORATORIO**”, de responsabilidad de la señorita ERIKA PAOLA RODRÍGUEZ OCHOA ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Ing. Mario Gustavo Villacrés Álvarez

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Ing. Cristina Gabriela Calderón Tapia MSc

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Erika Paola Rodríguez Ochoa, declaro que el presente Trabajo de titulación es de mi auditoría 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 autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Erika Paola Rodríguez Ochoa
C.I:060475471-3

Yo Erika Paola Rodríguez Ochoa soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Erika Paola Rodríguez Ochoa

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de titulación a mis padres, a mi hermano, abuelita, tíos porque en todo momento me han estado apoyando y su sacrificio ha sido incondicional, este logro es también para ellos.

Paola

AGRADECIMIENTO

Primeramente, quiero agradecer a Dios por darme la vida, salud y fuerzas para culminar con este trabajo de titulación. A mi segunda madre Elisa Tito por su apoyo incondicional que me ha permitido culminar con todo lo que me propuesto.

A mis padres Narciza Ochoa y Mario Rodríguez por el apoyo, ánimos en cada una de las etapas de mi carrera estudiantil.

De manera especial agradezco a mis tíos Beatriz, Segundo, a mi prima Germania, a Carlos Ayala, a mis mejores amigas y a mi toda mi familia porque han sido mi sombra, mi pilar para no rendirme y seguir con mis metas propuestas.

Como no agradecer a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO, a la Escuela de Ingeniería Química, a cada uno de sus docentes que con sus enseñanzas me han ayudado académicamente.

Por la confianza depositada al Ing. Mario Villacrés y a la Ing. Cristina Calderón.

Y agradezco al Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental por el apoyo y aporte en el financiamiento brindado para el desarrollo de la investigación.

Paola

TABLA DE CONTENIDOS

Páginas

RESUMEN.....	xvi
SUMMARY	xvii
CAPÍTULO I	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Identificación del problema.....	1
1.2. Justificación de la Investigación	2
1.3. Objetivos de la Investigación	3
1.3.1. Objetivo General	3
1.3.2. Objetivos Específicos.....	3
CAPÍTULO II	
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes de la Investigación	4
2.2. Marco Conceptual	6
2.2.1. Petróleo	6
2.2.1.1. Refinado del crudo de petróleo	6
2.2.2. Hidrocarburos.....	7
2.2.2.1. Clasificación de los Hidrocarburos	7
2.2.3. Contaminación del suelo con Hidrocarburos	8
2.2.4. Contaminantes.....	8
2.2.4.1. Hidrocarburos Totales de Petróleo.....	8
2.2.4.2. Metales Pesados	8
2.2.5. Bacterias Nativas.....	9
2.2.5.1. Modelización del crecimiento bacteriano y el consumo de sustrato limitante.....	9
2.2.6. Biorremediación.....	10
2.2.6.1. Ventajas y Desventajas de la Biorremediación	10
2.2.6.2. Desventajas de la biorremediación.....	10
2.2.7. Técnicas de Biorremediación	11

2.2.7.1.	Atenuación natural	11
2.2.7.2.	Biorremediación In Situ	12
2.2.7.3.	Bioventeo	12
2.2.7.4.	Bioestimulación	12
2.2.7.5.	Bioaumentación	13
2.2.7.6.	Biorremediación Ex situ.....	13
2.2.7.7.	Landfarming.....	13
2.2.7.8.	Biopilas	14
2.2.7.9.	Fitorremediación	14
2.2.7.10.	Biosuspensión	14
2.2.7.11.	Compost	15
2.2.8.	Factores que determinan la eficacia de la biorremediación para suelos.....	15
2.2.8.1.	Propiedades del Contaminante (biodegradabilidad)	15
2.2.8.2.	Temperatura	15
2.2.8.3.	Valor de pH.....	16
2.2.8.4.	Oxígeno.....	16
2.2.8.5.	Humedad	16
2.2.9.	Fundamentación bioquímica de la biorremediación	17
2.2.9.1.	Degradación aerobia.....	17
2.2.9.2.	Degradación anaerobia.....	17
2.2.10.	Reglamento Ambiental para las operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador	17

CAPÍTULO III

3.	METODOLOGÍA	19
3.1.	Hipótesis y Variables	19
3.1.1.	Hipótesis General	19
3.1.2.	Hipótesis Específicas	19
3.2.	Identificación de Variables	19
3.2.1.	Variables dependientes.....	19
3.2.2.	Variables independientes	20
3.3.	Matriz de consistencia.....	20
3.4.	Tipo y diseño de la investigación.....	22
3.4.1.	Esquema del proceso.....	22
3.4.2.	Distribución de unidades experimentales.....	23
3.5.	Unidad de análisis	23

3.6.	Población de estudio	23
3.7.	Tamaño de muestra	23
3.8.	Selección de muestra.....	24
3.8.1.	Lugar de investigación	24
3.8.2.	Ubicación del área contaminada	24
3.9.	Diseño aplicado.....	25
3.10.	Proceso experimental	26
3.10.1.	Determinación de hidrocarburos totales de petróleo.....	26
3.10.2.	Determinación de cadmio, níquel, plomo.	27
3.10.3.	Determinación del nitrógeno.....	28
3.10.4.	Determinación del pH	28
3.10.5.	Determinación de la humedad.....	28
3.10.6.	Determinación de la concentración bacteriana, mediante la técnica de diluciones sucesivas.....	29
3.10.7.	Siembra en placa	30
3.10.8.	Aislamiento y purificación de las cepas bacterianas	30
3.10.9.	Siembra de las cepas bacterianas	31
3.10.10.	Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas bacterianas.....	32
3.10.11.	Elaboración de bancos bacterianos	33
3.10.12.	Actividad emulsificante	33
3.10.13.	Prueba de degradación de hidrocarburos	34
3.10.14.	Prueba de antagonismo	35
3.10.15.	Preparación del Inóculo Bacteriano para la Siembra en el suelo	36
3.10.16.	Preparación del Suelo con el Tratamiento A.....	36
3.10.17.	Preparación del Suelo con el Tratamiento B.....	37
3.10.18.	Preparación del Suelo con el Tratamiento C.....	38

CAPÍTULO IV

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
4.1.	Análisis de Resultados	39
4.1.1.	Caracterización del suelo	39
4.1.2.	Caracterización Macroscópica y Microscópica.....	40
4.1.2.1.	Resultado de Caracterización Microscópica de las 51 cepas bacterianas	42
4.1.3.	Prueba de Emulsificación.....	44
4.1.4.	Prueba de Antagonismo	47

4.1.5.	Selección del consorcio Bacteriano.....	48
4.1.6.	Caracterización Microbiológica del Consorcio Bacteriano.	50
4.1.6.1.	Prueba Catalasa	50
4.1.6.2.	Caracterización Macroscópica del Consorcio Bacteriano.....	51
4.1.7.	Resultado del valor de pH en el proceso de biorremediación	52
4.1.7.1.	Carta parámetro de control- pH.....	52
4.1.8.	Resultado de la Humedad en el proceso de biorremediación.....	53
4.1.8.1.	Resultado del Conteo Bacteriano en los tratamientos: A, B y C con sus correspondientes repeticiones.	54
4.1.8.2.	Cartas de control parámetros-Conteo bacteriano	55
4.1.9.	Resultado del parámetro de Temperatura.....	56
4.1.10.	Concentración de TPH en el proceso de Biorremediación.....	56
4.1.10.1.	Cartas de control parámetros -Hidrocarburos Totales de Petróleo.....	57
4.1.11.	Resultados de la Caracterización de Ni, Pb, Cd y N del suelo biorremediado.....	58
4.1.12.	Resultado del proceso de biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos.	59
4.2.	Pruebas de Hipótesis	59
4.3.	Discusión de Resultados	68
	CONCLUSIONES.....	71
	RECOMENDACIONES.....	72
	GLOSARIO	
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1-2: Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en . todas las fases de industria hidrocarburífera medidos en mg/kg.....	18
Tabla 2 - 3: Matriz de Consistencia	20
Tabla 3-3: Coordenadas de la Estación Secoya	25
Tabla 1-4: Resultado de la Caracterización del suelo.	39
Tabla 2- 4: Resultado de Caracterización Macroscópica de las cepas bacterianas.	40
Tabla 3-4: Gram-Positivas.	42
Tabla 4-4: Gram-Negativas.	43
Tabla 5-4: Resultado de la Actividad Emulsificante.....	44
Tabla 6-4: Resultado de la Prueba Degradación de Hidrocarburos de acuerdo con la turbidez	46
Tabla 7-4: Resultado de la prueba de Antagonismo	47
Tabla 8-4: Resultado de la selección del consorcio Bacteriano	48
Tabla 9-4: Resultado de la Caracterización Microbiológica del Consorcio Bacteriano	50
Tabla 10-4: Resultado de la Prueba Catalasa.....	50
Tabla 11-4: Resultado de Morfología y Pigmentación Microbiana.	51
Tabla 12-4: Resultado del valor de pH.	52
Tabla 13-4: Resultado de la Humedad, expresados en %.	53
Tabla 14-4: Resultado del Conteo Bacteriano expresadas en UFC/g.	54
Tabla 15-4: Resultado de la Temperatura, expresada en °C.	56
Tabla 16-4: Variación de la concentración de TPH en el proceso de biorremediación en . Unidades de mg/kg.....	56
Tabla 17-4: Caracterización de Ni, Pb, Cd y N.....	58
Tabla 18-4: Resultado del proceso de biorremediación del suelo contaminado con TPH.....	59
Tabla 19-4: Resumen	60
Tabla 20-4: Análisis de varianza Anova para Valor de pH.	60
Tabla 21- 4: Cálculo de diferencia metodo tukey valor pH.	61
Tabla 22-4: Resumen análisis Anova Humedad.	62
Tabla 23-4: Análisis de varianza Anova para Humedad.....	62
Tabla 24-4: Cálculo de diferencia metodo Tukey Humedad.	63

Tabla 25-4: Resumen Análisis de varianza Anova Variación concentración de TPH.....	64
Tabla 26-4: Análisis de varianza Anova Variación de la concentración de TPH.....	64
Tabla 27-4: Cálculo de diferencia método tukey Variación de la.....	65
Tabla 28-4: Resumen Análisis de varianza Anova Variación de la concentración Caracterización de Ni, Pb, Cd y N.	66
Tabla 29-4: Análisis de varianza Anova Variación de la concentración Caracterización de Ni, Pb, Cd y N.....	66
Tabla 30-4: Cálculo de diferencia metodo tukey variación de . la Caracterización de Ni, Pb, Cd y N	67

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1-2: Fases de crecimiento.....	9
Figura 2-2: Esquema de las técnicas de biorremediación.....	11
Figura 3-3 Esquema del proceso de biorremediación.....	22
Figura 4-3: Mapa geográfico de la Estación Secoya.....	25

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Páginas
Gráfico 1-4: Valores de pH durante el proceso de biorremediación.....	52
Gráfico 2-4: Variación de la Humedad durante el proceso de biorremediación.....	54
Gráfico 3-4: Variación del Conteo Bacteriano durante el proceso de biorremediación.....	55
Gráfico 4-4: Concentración de TPH durante el proceso de biorremediación.....	57

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexos A:** Preparación de las diluciones sucesivas
- Anexos B:** Conteo de microorganismos
- Anexos C:** Inoculación de las diluciones en cada caja Petri.
- Anexos D:** Identificación de cada cepa bacteriana
- Anexos E:** Siembra de las cepas bacterianas seleccionadas en cada caja petri
- Anexos F:** Clasificación de las Cepas bacterianas
- Anexos G:** Observación de placas al microscopio
- Anexos H :** Realización de la Prueba Catalasa
- Anexos I:** Dosificación de cada cepa bacteriana en los tubos eppendorf
- Anexos J:** Dosificación en los matraces con sus respectivas cepas bacterianas más el medio mínimo
- Anexos K:** Dosificación de petróleo en los matraces con cepas bacterianas
- Anexos L:** Agitación de los matraces en presencia de luz
- Anexos M:** Observación de la degradación de hidrocarburos
- Anexos N :** Lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro
- Anexos O:** Siembra de las cepas bacterianas para la prueba de antagonismo
- Anexos P:** Identificación de las cepas antagónicas
- Anexos Q :** Selección de las 10 cepas bacterianas para el consorcio bacteriano
- Anexos R:** Elaboración del inóculo para la siembra
- Anexos S:** Siembra del inóculo al suelo contaminado
- Anexos T:** Suelo en proceso de Biorremediación
- Anexos U:** Tabla Criterios de Calidad de Suelo
- Anexos V:** Tabla Criterios de Remediación o Restauración del Suelo
- Anexos W:** Tabla de Cuantiles de la distribución de Tukey
- Anexos X:** Informes de los resultados de la caracterización del suelo

RESUMEN

Se desarrolló la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos provenientes de la Estación de Secoya, para realizar un consorcio bacteriano nativo aerobio y disminuir la concentración de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH), esta investigación se realizó en el laboratorio (CESTTA). La técnica de biorremediación empleada fue por bioaumentación, se realizó la caracterización físico-química y microbiológica del suelo contaminado, diluciones sucesivas, aislamiento y purificación, siembra en placa, caracterización macroscópica y microscópica. Finalmente se realizó las pruebas de selección: actividad emulsificante, poder degradativo y antagonismo. Al finalizar las pruebas de selección se obtuvo 10 cepas bacterianas que conformaron el consorcio bacteriano aerobio, se realizó el inóculo para dosificarlo en el suelo contaminado con hidrocarburos. El suelo se sometió a tres tratamientos diferentes: tratamiento A, B y C, cada uno con sus 3 repeticiones; cada tratamiento contenía 1 kg de suelo contaminado al igual que sus repeticiones con un total de 9 Kg. Para el tratamiento A: se adicionó (500 mL de inóculo), Tratamiento B (500 mL de inóculo más el 30 % de materia orgánica) y para el tratamiento C (no se adicionó inóculo ni materia orgánica). Se llevó un registro de parámetros de control de pH, humedad y conteo bacteriano, con el fin de proporcionar condiciones adecuadas para el desarrollo del consorcio bacteriano. Como resultado el Tratamiento A obtuvo el 76.90%, Tratamiento B el 86% y Tratamiento C el 22,10% de remoción de TPH. Como resultado se determinó que el TB obtuvo la más alta remoción de TPH con el 86% en 52 días, alcanzándose la hipótesis planteada. Se recomienda hacer mayores estudios orientados a la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos y otros contaminantes mediante la obtención de consorcios bacterianos aerobios.

PALABRAS CLAVES: <INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA>, <BIORREMEDIACIÓN>, <SUELOS CONTAMINADOS >, <HIDROCARBUROS >, <CONSORCIO BACTERIANO >, <BIOAUMENTACIÓN>

SUMMARY

The bioremediation of soils contaminated with hydrocarbons from the Secoya Station was developed in order to carry out a bacterial native aerobic consortium and reduce the concentration of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH), this research was carried out in the laboratory (CESITA). The bioremediation technique used was by bioaugmentation, physical-chemical and microbiological characterization of contaminated soil, successive dilutions, isolation and purification, plating, macroscopic and microscopic characterization. Finally, the selection tests were carried out: emulsifying activity, degradative power and antagonism. When the selection tests were carried out, 10 bacterial strains were obtained that formed the aerobic bacterial consortium. The inoculum was used to dose it in the soil contaminated with hydrocarbons. The soil underwent three different treatments: Treatment A, B and C, each with its three repetitions; each treatment contained 1kg of contaminated soil as well as its repetitions with a total of 9 kg. For treatment A: it was added (500 mL of inoculum), Treatment B (500 mL of inoculum plus 30% of organic matter) and for treatment C (no inoculum or organic matter was added). A record of pH, humidity and bacterial count control parameters was taken, in order to provide adequate conditions for the development of the bacterial consortium. As a result Treatment A obtained 76.90%, Treatment B 86% and Treatment C 22.10% removal of TPH. As a result, it was determined that TB obtained the highest TPH removal with 86% in 52 days, reaching the hypothesis proposed. It is recommended to carry out further studies aimed at the bioremediation of soils contaminated with hydrocarbons and other pollutants by obtaining aerobic bacterial consortiums.

KEY WORDS: <ENGINEERING AND CHEMICAL TECHNOLOGY>, <BIOREMEDIATION>, <CONTAMINATED SOILS>, <HYDROCARBONS>, <BACTERIAL CONSORTIUM>,<BIOAUGMENTATION>.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Identificación del problema

La contaminación por hidrocarburos es una problemática de carácter mundial y especialmente en nuestro país, ya que afecta a la flora, fauna, suelos, ríos y también al ser humano, por ejemplo: los principales efectos que causan los hidrocarburos en el suelo son: el menor rendimiento de cultivos, pérdida de calidad de productos obtenidos, retardación del crecimiento de la vegetación en la zona contaminada, etc. Estos factores van a depender de acuerdo con las características fisicoquímicas de los suelos (Cando, 2011, p. 23).

El Ecuador se ve reflejado con este problema debido a la explotación del petróleo, en especial en la Amazonía cuyas cercanías existen poblaciones que se han visto afectadas a causa de los derrames e inadecuado tratamiento de los suelos contaminados como es el caso de la Estación Secoya que está ubicada dentro del Campo Secoya, la cual forma parte del área Libertador-ubicada en la provincia de Sucumbíos, en el nororiente de la Amazonía Ecuatoriana. (Simbaña, 2016, p. 1)

El Área Libertador tiene una extensión de 25.000 hectáreas. Está conformado por 13 campos y distribuido en estaciones de producción las mismas que se encargan de registrar y monitorear la producción de petróleo de pozos que se encuentran en los campos Secoya, Pichincha, Shuara y Shushuqui. La Estación Secoya maneja un promedio de 22745 BFPD de petróleo y agua (Reatiqui, 2015, pp. 133-134). En esta estación Secoya es frecuente los derrames de crudo, por ejemplo, en el año 2005 ocurrió un derrame de crudo en una propiedad, el derrame cubrió aproximadamente 3 ½ hectáreas donde había árboles maderables y cultivos de café y caña. La empresa se encargó de los trabajos de remediación que consistieron en lavar la tierra, recoger el crudo, y desechar los residuos utilizando una bomba de succión de agua. Por el cual se aplicó remediación (Almeida & Suárez, 2005).

Debido a consecuencias de derrames de petróleo, ruptura de tuberías que ha sufrido la estación Secoya es proclive a la contaminación de suelos, se consideró la estación Secoya con objeto de estudio, el cual proporcionó información de ser suelos contaminados por hidrocarburos y no se lo realizó ningún tratamiento de biorremediación, sin dar la causa exacta del porqué ocurrió los efectos de contaminación, siendo una información confidencial. Por este motivo se decidió desarrollar esta investigación, con el objetivo de biorremediar los suelos y verificar la capacidad degradativa del consorcio bacteriano aerobio frente a los hidrocarburos para poderlo utilizar en futuros derrames o investigaciones (Cando, 2011, p. 2)

En la actualidad se han desarrollado diversas técnicas de biorremediación que permiten recuperar la calidad de suelo que ha sido afectado por la contaminación de hidrocarburos. Para aplicar los procedimientos de biorremediación primero se debe seleccionar la técnica a emplearse, esta va a depender de acuerdo con el tipo de contaminante y las características fisicoquímicas del suelo (Cando, 2011, p. 58).

Para Suarez (2013)“El tratamiento de biorremediación para suelos contaminados con hidrocarburos pueden ser eficientes, económicos y factibles si las condiciones de biorremediación son óptimas” (p. 13). Existen importantes cepas biodegradativas eficaces en la biorremediación de hidrocarburos y otros contaminantes donde se destacan los géneros: *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Streptomyces*. Los *Streptomyces* y los *Bacillus* son las bacterias más eficientes en la degradación de hidrocarburos. La capacidad de estas bacterias depende del tiempo de contacto con el contaminante y las condiciones ambientales en las que se desarrollen (Arboleda & Bravo, 2008, p. 34).

1.2. Justificación de la Investigación

Debido a la contaminación por hidrocarburos existente en los suelos de la Estación Secoya es necesario determinar un método de tratabilidad alternativo para aliviar esta problemática. (Simbaña, 2016, p. 2)Por lo que se ha visto la necesidad de utilizar un proceso de biorremediación para sus suelos contaminados. Debido a que los hidrocarburos que presentan afectan las propiedades fisicoquímicas del suelo, como el pH, textura, permeabilidad, pérdida de capacidad de soporte al crecimiento vegetal causando un impacto ambiental. (Simbaña, 2016, p. 2)

Por este motivo, este proyecto tiene como finalidad de biorremediar los suelos contaminados con hidrocarburos provenientes de la Estación Secoya para la degradación de hidrocarburos a escala de

laboratorio aplicando la técnica de bioaumentación (adición de bacterias nativas degradadoras de hidrocarburos) mediante un consorcio bacteriano aerobio y se realizó de forma ex-situ (el suelo contaminado se traslada al Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental para su tratamiento). Con la finalidad de disminuir la concentración de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH), utilizando la capacidad de ciertas cepas bacterianas para su degradación total o parcial, al utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono y energía en sus procesos metabólicos, siendo la técnica de bioaumentación eficiente para la biorremediación de TPH en suelos contaminados con hidrocarburos. (Arboleda & Bravo, 2008).

La investigación se realizó gracias al Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA) que permitió realizar el diseño experimental y contactaron a la Estación Secoya para trasladar sus suelos contaminados y tratarlos.

En esta investigación se ha presentado los siguientes objetivos:

1.3. Objetivos de la Investigación

1.3.1. Objetivo General

- Biorremediar suelos contaminados con hidrocarburos de la Estación de Secoya utilizando un consorcio bacteriano aerobio a escala de laboratorio.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar físico-química y microbiológicamente los suelos contaminados en base a la Normativa Ambiental Tabla 2. Anexo 2 del Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio de Ambiente y tabla 6 del RAOHE-1215.
- Seleccionar las cepas potenciales mediante las pruebas de antagonismo y degradación para procesos de biorremediación y caracterizar el consorcio bacteriano desarrollando su producción.
- Sembrar las bacterias en el suelo y al suelo remediado verificar si cumple con las Normativas Ambientales de la Tabla 3. Anexo 2 del Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio de Ambiente y tabla 6 del RAOHE-1215.
- Definir el porcentaje de degradabilidad que presenta el consorcio bacteriano aislado.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la Investigación

El problema de la contaminación por petróleo y sus derivados es de especial estudio debido a los efectos tóxicos del petróleo derramado. Los accidentes de contaminación tanto en la tierra como en el agua resultan muy probables en la industria petrolera, debido a que manejan grandes volúmenes de hidrocarburos. De esta manera los derrames pueden provenir de dos fuentes: terrestres (ruptura de ductos y mal almacenamiento, transportación, manejo inadecuado de lodos de acumulación, entre otras causas) y marítimas (operaciones de limpieza, carga, descarga, colisiones de buques tanqueros, ruptura de ductos submarinos, etc.) (Acosta, 2012, p. 10)

Una de las mejores técnicas es la biorremediación, para controlar este problema. Su principal objetivo es disminuir la concentración de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH) (Arboleda & Bravo, 2008, p. 19).

Por esta razón se han realizado varias investigaciones eficaces para los procesos de biorremediación:

Para la determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en la central termoeléctrica “El Descanso” en la provincia de Azuay-Ecuador, debido a un derrame de hidrocarburos. Y se realizó con pruebas y bioensayos, considerando tres tratamientos: T1 (terreno mineral y el microorganismo *Streptomyces*), T2 (caldo de cultivo Tripticasa de Soya y el microorganismo *Streptomyces*) y en el T3 (consorcio microbiano). Como resultado se obtuvo que en la degradación de TPH el tratamiento 3 fue el mejor en degradar con un

valor de 29.7 % y para los compuestos HAPs hubo un resultado con la degradación de Naftaleno al 99.02 %. (Cando, 2011, p. 135).

“Como conclusión general de esta investigación se pudo establecer que el mejor tratamiento en la biodegradación de hidrocarburos en cuanto a TPH y HAPs fue el tratamiento 3 (consorcio microbiano), formado por la bacteria (*Streptomyces*) más *bacilo*” (Cando, 2011, p. 135).

Para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos se utilizó la técnica de bioaumentación y a partir de un consorcio bacteriano, el propósito de esta investigación es el saneamiento ambiental de una zona costera contaminada de Punta Majagua en Cuba y se diseñó un área de biorremediación de 115 m x 75 m donde se dispusieron 473 m³ de residual mezclando con tierra fértil, se aplicó 76 640 L de consorcio bacteriano producidos en un biorreactor de 12 000 L. Como resultado se obtuvo la remoción del 90 % TPH durante 120 días de tratamiento con el consorcio bacteriano y mediante el análisis costo-beneficio se determinó que su economía es factible (Acosta, 2012, p. 62).

Otra investigación importante se enfocó en el aislamiento, identificación y elaboración de consorcios bacterianos para biorremediación de aguas y sedimentos contaminados provenientes del residual de las muestras ingresadas al laboratorio CESTTA. Se realizó la caracterización fisicoquímica y microbiológica de los suelos y aguas mediante el aislamiento, purificación y la técnica de siembras sucesivas de cepas, se incluyó la reducción de metales. Al finalizar las pruebas de selección se obtuvo 9 cepas bacterianas que se agruparon en 3 consorcios: A, B y C. Como resultado la selección del consorcio C fue el más efectivo por presentar porcentajes más altos en la reducción de TPH 96,14 % (Miranda, 2015, pp. 55-57).

Existen otros tratamientos para la biorremediación de los suelos contaminados con hidrocarburos, una técnica recomendada es Landfarming, donde la presente investigación tiene como objetivo biorremediar suelo contaminado con hidrocarburo de la Central Hidroeléctrica del Campo Secoya por Landfarming. Se realizó mediante 4 tratamientos con suelo contaminado, los tres primeros tratamientos fueron tratados con nutrientes orgánicos vegetales y aserrín y el cuarto Tratamiento fue una degradación natural. Como resultados se obtuvo una reducción de TPH en un 72% del TB, 53% del TC y un 36% del TA, obteniendo como resultado el mejor tratamiento: el TB con la más alta remoción de hidrocarburo de 72% (Arboleda & Bravo, 2008, pp. 98-99).

Como resultado de las anteriores investigaciones indican que existen eventos de contaminación de suelos por hidrocarburos, motivo por el cual es importante tratar el suelo con microorganismos al ser procesos eficaces y amigables con el medio ambiente.

2.2. Marco Conceptual

2.2.1. *Petróleo*

El término petróleo se deriva del latín *Petroleum*, y está formado por dos términos Petra que significa piedra y óleum que significa aceite, definiéndose como una mezcla heterogénea de compuestos orgánicos, principalmente hidrocarburos insolubles en agua. El petróleo es el energético más importante y es un recurso natural no renovable (Cando, 2011, pp. 46-47).

El petróleo es la degradación de la materia orgánica, durante largos períodos de tiempo y bajo condiciones de alta presión y temperatura convirtiéndose en gas natural, crudo y derivados del petróleo. El petróleo crudo es una mezcla compleja y variable de compuestos orgánicos, donde la mayoría de ellos son hidrocarburos que varían en peso molecular desde el gas metano hasta los altos pesos de alquitranes (Muñoz & Pacheco, 2017, p. 9).

2.2.1.1. *Refinado del crudo de petróleo*

Para comprender la naturaleza química de los diferentes derivados del petróleo que principalmente pueden ser contaminantes en el medio ambiente, se necesita entender el proceso de refinado del crudo del petróleo. (Muñoz & Pacheco, 2017, p. 10).

Esta refinación consiste en la separación del crudo en diferentes fracciones. Estas fracciones deben someterse a tratamientos térmicos y químicos para mejorar su estructura, su utilidad, como es el caso de las gasolinas y grasas. La separación involucra el transporte del crudo por tuberías a través de hornos, dando como resultados líquidos y vapores los cuales pasan hasta las torres de destilación. Estas torres están calientes en el fondo y a medida que se elevan la temperatura disminuye. El crudo de petróleo se separa en fracciones de acuerdo con el punto de ebullición y el peso molecular. Las fracciones más livianas, como el gas propano, la gasolina, se vaporizan y elevan hasta la parte más alta de la columna. Los querosenos y diésel se mantienen en la mitad de la columna; los líquidos

pesados como gasoil y aceites lubricantes se separan en la parte baja y por último el residuo que son las fracciones más pesadas y que tienen un punto de ebullición más alto, se asientan al fondo de la columna. Este residuo se destila nuevamente al vacío para obtener otro tipo de aceites lubricantes, ceras, parafinas y betunes asfálticos (alquitranes) (Muñoz & Pacheco, 2017, pp. 10-11).

Los productos refinados contienen hidrocarburos alifáticos, aromáticos, policíclicos aromáticos, también compuestos orgánicos polares, estos últimos están constituidos por compuestos que contienen átomos polares de sulfuro, oxígeno y nitrógeno, siendo fracciones no tan representativas ejemplo el nitrógeno con una concentración menor al 1%. Además, el petróleo puede contener concentraciones variables de metales pesados tales como arsénico, mercurio, plomo, zinc y níquel. (Muñoz & Pacheco, 2017, pp. 10-11).

2.2.2. Hidrocarburos

Los hidrocarburos están compuestos por átomos de carbono e hidrógeno y de acuerdo a la naturaleza que muestran los enlaces C-C, se clasifican en dos tipos: hidrocarburos alifáticos e hidrocarburos aromáticos (Simbaña, 2016, pp. 15-16).

2.2.2.1. Clasificación de los Hidrocarburos

Hidrocarburos alifáticos: también conocidos como hidrocarburos de cadena abierta, se dividen de acuerdo con el enlace entre en dos átomos de carbono, entre ellos tenemos: alcanos (enlace simple), alquenos (enlace doble) y alquinos (enlace triple). Los compuestos alifáticos más comunes son lo alcanos (Muñoz & Pacheco, 2017, pp. 10-11).

Hidrocarburos aromáticos: son compuestos que se caracterizan por presentar olores intensos y por ser derivados del benceno, debido a la presencia de su estructura cíclica, el benceno a su vez presenta cierta inestabilidad debido a la particularidad de disponer dobles enlaces conjugados. (Simbaña, 2016, pp. 15-16).

Hidrocarburos alifáticos cíclicos hace referencia a: ciclo parafinas y naftenos, constituyendo en menor proporción en el petróleo crudo. (Simbaña, 2016, pp. 15-16).

Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos: Conocidos generalmente como HAPs y son caracterizados Por poseer estructuras formadas por 2 o más moléculas de benceno (Simbaña, 2016, pp. 15-16).

2.2.3. Contaminación del suelo con Hidrocarburos

El suelo contaminado es todo aquel cuyas características físicas-químicas y biológicas naturales han sido alteradas debido a actividades antropogénicas y representan un riesgo para el medio ambiente. Químicamente, el petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos, principalmente formado por carbono e hidrógeno, con contenidos menores de otros elementos como: nitrógeno o trazas de metales, azufre, etc. (Rodríguez, 2008, pp. 26-27).

En la contaminación del suelo con hidrocarburos los componentes individuales pueden separarse de la mezcla inicial, ejemplos: los Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs) y otros son degradados por microorganismos del suelo, etc. (Rodríguez, 2008, pp. 26-27)

2.2.4. Contaminantes

2.2.4.1. Hidrocarburos Totales de Petróleo

Los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) son una mezcla de productos químicos compuestos principalmente de carbono e hidrógeno. (Miranda, 2015, p. 6).

Los TPH se dividen en grupos llamados fracciones de hidrocarburos de petróleo, que se comportan en forma similar en el suelo o en el agua. Algunas sustancias químicas que pueden encontrarse en los TPH incluyen a hexano, benceno, tolueno, xilenos, fluoreno y naftalina y también contienen otros productos de petróleo y componentes de gasolina (Miranda, 2015, p. 6).

2.2.4.2. Metales Pesados

Los metales pesados son todos aquellos elementos metálicos o metaloides, de mayor o menor densidad, que aparecen frecuentemente asociados en problemas de contaminación. (Miranda, 2015, p. 7).

Algunos de ellos se consideran esenciales para el organismo en pequeñas cantidades, como el Fe, Mn, Zn, B, Co, As, V, Cu, Ni o Mo, y otros se vuelven nocivos cuando se presentan en concentraciones elevadas, no desempeñan ninguna función biológica y resultan altamente tóxicos, ejemplo de ellos son el Cd, Ni y el Pb (Miranda, 2015, p. 7).

2.2.5. Bacterias Nativas

Los llamados organismos hidrocarburoclásticos son bacterias y hongos capaces de metabolizar y degradar el petróleo. Las fracciones del total de microorganismos que metabolizan hidrocarburos es muy variable, así tenemos: 6% al 82 % para hongos terrestres, 0,13% a 50 % para bacterias terrestres y 0,003% a 100 % para bacterias marinas (Arboleda & Bravo, 2008, pp. 33-34).

Por otra parte, comunidad microbiana posee la actividad degradativa que es uno de los principales mecanismos por el cual se elimina el petróleo y otros hidrocarburos contaminantes (Arboleda & Bravo, 2008, pp. 33-34).

2.2.5.1. Modelización del crecimiento bacteriano y el consumo de sustrato limitante

El crecimiento bacteriano bajo condiciones favorables se puede modelizar en 4 fases:

Fase de retraso: no existe crecimiento bacteriano.

Fase de crecimiento microbiano exponencial: debido a la rápida fisión binaria de células, es decir su reproducción. (Arboleda & Bravo, 2008, pp. 45-46)

Fase estacionaria: el número de bacterias se vuelve constante. Una de las causas principales de esta etapa es el agotamiento del sustrato ya que controla el crecimiento microbiano.

Fase de decadencia: el sustrato se está agotado para el sustento de los microorganismos. (Arboleda & Bravo, 2008, pp. 45-46)

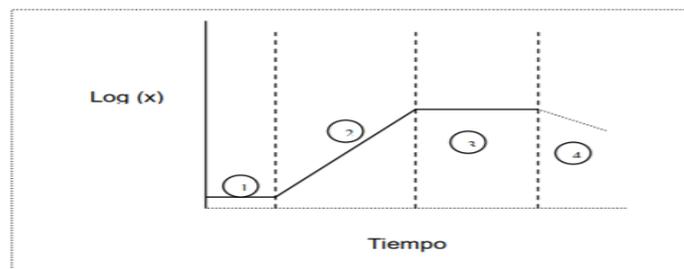


Figura 1-2: Fases de crecimiento

Fuente: (Arboleda & Bravo, 2008)

2.2.6. Biorremediación

Según (Flores & Mendoza, 2017, p. 24) La biorremediación es aquella tecnología que consiste en el uso de microorganismos como plantas, algas, hongos y bacterias. “El objetivo de la biorremediación es eliminar, reducir contaminantes en el suelo y agua a través de organismos vivos, en ocasiones emplea mezcla de microorganismos generalmente cepas específicas de bacterias” (Simbaña Cazar, 2016, p. 18).

Algunos microorganismos obtienen los nutrientes y energía necesaria para desarrollarse al descomponer los diferentes contaminantes consiguiendo como resultado de esta descomposición dióxido de carbono y agua, al terminar su fuente de alimento la población microbiana disminuye hasta desaparecer. (Flores & Mendoza, 2017, p. 24).

“La biorremediación ha tenido sus mejores rendimientos en procesos de degradación de hidrocarburos” (Flores & Mendoza, 2017, p. 24).

2.2.6.1. Ventajas y Desventajas de la Biorremediación

Entre las principales ventajas de la biorremediación tenemos:

- ✓ Posibilidad de aplicarse de forma in situ o ex situ.
- ✓ No requieren de equipamientos especializados para su aplicación.
- ✓ Posee un Alto nivel degradativo.
- ✓ Amplio rango de aplicabilidad.
- ✓ Existe la destrucción de contaminantes.
- ✓ No existe destrucción del suelo.
- ✓ Bajo costo de aplicación.
- ✓ Posibilidad de recuperar el suelo contaminado (Flores & Mendoza, 2017, p. 25).

2.2.6.2. Desventajas de la biorremediación

- ✓ El aplicable a compuestos que sean biodegradables.
- ✓ Es difícil calcular el tiempo requerido para un proceso adecuado.

- ✓ Se necesita información del lugar y tipo de contaminación para mejores resultados (Flores & Mendoza, 2017, p. 25).

2.2.7. Técnicas de Biorremediación

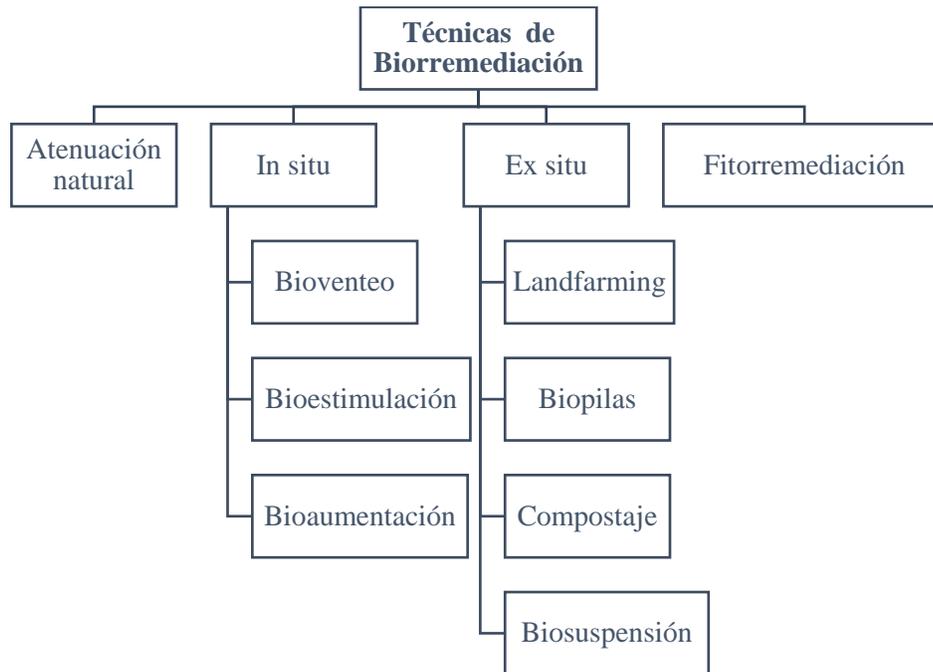


Figura 2-2: Esquema de las técnicas de biorremediación

Fuente: (Flores & Mendoza, 2017, p. 26).

2.2.7.1. Atenuación natural

Es conocida también como degradación natural, se basa principalmente en que el petróleo es rico en materia orgánica, los hidrocarburos que contiene son fácilmente atacados en condiciones aerobias, es decir en condiciones de aire y humedad. (Cando, 2011, p. 63).

La atenuación natural requiere de estudios previos garantizados en (análisis in vitro-laboratorio) para que alcance el objetivo de biorremediación (Cando, 2011, p. 63).

2.2.7.2. Biorremediación In Situ

Consiste en la utilización de microorganismos (autóctonos o nativos) mediante la aportación de nutrientes, oxigenación, e inoculación de consorcios bacterianos. Es un tratamiento que se realiza en el mismo sitio en donde se encuentra la contaminación y trata al suelo sin la necesidad de excavarlo ni transportarlo contribuyendo la disminución de costos. Las técnicas de biorremediación in situ son: bioventeo, bioestimulación y bioaumentación (Cando, 2011, p. 64).

2.2.7.3. Bioventeo

Según Cando (2011) Consiste en suministrar aire al terreno contaminado, se realiza a través de pozos de extracción con bajas velocidades de flujo con la finalidad de impulsar la actividad de microorganismos presentes en el suelo, biodegradar hidrocarburos y suministrar la cantidad de oxígeno necesario (p. 67). Su desventaja sería presentar un suelo una baja cantidad de humedad, los hidrocarburos deben encontrarse en el suelo con concentraciones menores 50 000 ppm, al no ser un suelo homogéneo dificulta que el caudal de aire pase a la zona contaminada, requiriendo largos periodos de tiempo para obtener la concentración de hidrocarburo deseada. Y además la descontaminación se llevaría a cabo por la volatilización de compuestos más no por la biodegradación (Suarez, 2013, pp. 23-24).

2.2.7.4. Bioestimulación

Consiste en la activación de microorganismos autóctonos degradadores de hidrocarburos mediante la adición de nutrientes al sector contaminado. Se pueden dar en condiciones aerobias o anaerobias: (Cando, 2011, pp. 64-65)

Se debe considerar las siguientes características para que se realice con efectividad esta técnica:

- ✓ Suelo homogéneo casi en su totalidad.
- ✓ Permeabilidad de aire.
- ✓ Valor de pH 6 -8.
- ✓ Debe presentar una humedad entre 12 -30 %.
- ✓ Temperatura entre 10 y 49 °C (Cando, 2011, pp. 64-65).

2.2.7.5. Bioaugmentación

Esta técnica funciona en condiciones de laboratorio, depende de la adición controlada de cepas bacterianas nativas para mejorar la biorremediación. (Suarez, 2013, p. 23). En condiciones controladas ésta es una técnica práctica, efectiva y económicamente para eliminar la contaminación por hidrocarburos.

El tamaño de inóculo a emplearse depende de la extensión de la zona contaminada y de la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores ya que por lo general los contaminantes son la única fuente de alimento para los microorganismos inoculados. La aplicación de un consorcio bacteriano (se define como asociaciones o población microbiana con una mayor eficiencia en la degradación de hidrocarburos u otros contaminantes) (Miranda, 2015, p. 5) permitiendo la conversión de hidrocarburo a CO₂, H₂O y biomasa, cuando se agota la fuente de carbono disminuyen los microorganismos disminuyendo su población (Cando Rodríguez, 2011 pág. 66).

La principal ventaja es que no requiere de un área adicional para llevar a cabo el tratamiento, ni el uso de maquinaria pesada. Se debe realizar algunos procedimientos como siembra, aislamiento de consorcios bacterianos capaces de utilizar el contaminante como fuente de carbono y cultivarlos hasta obtener grandes cantidades de biomasa (Cando, 2011, p. 66).

2.2.7.6. Biorremediación Ex situ

Este proceso se realiza luego de excavar el medio contaminado y trasladarlo a otro lugar para realizar el tratamiento. (Cando, 2011, p. 69).

2.2.7.7. Landfarming

Llamado también tratamiento superficial en tierra es una técnica de biorremediación aerobia utilizada para la reducción de concentración de TPH en suelos contaminados, (Cando, 2011, p. 69). Esta técnica consiste en excavar suelos contaminados, extenderlos sobre un área suficientemente amplia, promover la actividad de los microorganismos encargados de degradar los hidrocarburos mediante la aireación o volteo. Previo de extender el suelo contaminado se debe adecuar las condiciones de superficie para controlar los lixiviados y aguas lluvias, una vez realizado estas condiciones se irriga

con las soluciones de nutrientes los microorganismos y aditivos químicos en el caso que sean necesarios (Suarez, 2013, pp. 28-29).

Se debe airear el suelo periódicamente con ayuda de tractores, retroexcavadoras y sistemas de inyección de aire comprimido. En el proceso se utilizan bacterias nativas para degradar los componentes de petróleo. El manejo de esta técnica implica una investigación preliminar del control del sitio de degradación, actividad biológica, clima, etc. (Suarez, 2013, pp. 28-29).

2.2.7.8. Biopilas

También llamado bioceldas, consiste en la reducción de contaminantes derivados de petróleo. (Suarez, 2013, p. 29). Se forman pilas de dimensión variable con una mezcla de suelo contaminado previamente excavado y materia orgánica, estas biopilas disponen de un sistema de recolección de lixiviados, las pilas son aireadas mediante tubos perforados de aire con distribución permanente de nutrientes, microorganismos y aire. Los montones de suelo no deben exceder los 3 metros como máximo y pueden estar cubiertos en la parte superior por plásticos impermeables para controlar la volatilización (COVs), para seleccionar un sistema de biopilas y que sea eficiente depende principalmente de las condiciones climáticas, de los componentes orgánicos volátiles presentes en el suelo contaminado y también de las siguientes condiciones: poseer una densidad microbiana superior a 1.000 UFC/gramo de suelo, el valor pH debe estar entre 6 y 8, la humedad entre 40 y 85 %, con una temperatura entre 10 y 45 °C, baja proporción de arcilla, baja presencia de metales pesados y proporción normal de nutrientes (Cando, 2011, pp. 71-72).

2.2.7.9. Fitorremediación

Es una técnica de la biorremediación que se basa en el uso de plantas arbóreas, herbáceas y algas, para metabolizar, absorber, estabilizar contaminantes orgánicos e inorgánicos que se encuentren en el suelo, agua incluso en el aire mediante procesos bioquímicos (Flores & Mendoza, 2017, p. 29).

2.2.7.10. Biosuspensión

También conocido como birreactor en suspensión es el tratamiento mediante el cual el suelo excavado es introducido en un biorreactor para transformar de manera controlada los compuestos refractarios. En el biorreactor se adiciona un cultivo microbiano, agua y nutrientes para llevar a cabo la degradación.

El resultado de este tratamiento es un suelo que puede ser regresado a su lugar origen, este método trata materiales orgánicos e inorgánicos (Flores & Mendoza, 2017, p. 29).

2.2.7.11. Compost

Es un proceso aerobio que se realiza bajo condiciones controladas donde los residuos orgánicos biodegradables se descomponen mediante una oxidación bioquímica de bacterias, hongos, lombrices, generando energía calórica, CO₂, H₂O y materia orgánica o compost. (Flores & Mendoza, 2017, p. 30).

Como resultado es la obtención de uno de los mejores abonos orgánicos o de uso agrícola como acondicionador de suelos (Flores & Mendoza, 2017, p. 30).

2.2.8. Factores que determinan la eficacia de la biorremediación para suelos

Para degradar de manera óptima los hidrocarburos presentes en el petróleo existe una serie de factores que pueden ayudar a mejorar el proceso de biorremediación y también a la comunidad microbiana. (Muñoz & Pacheco, 2017, p. 18).

2.2.8.1. Propiedades del Contaminante (biodegradabilidad)

En los componentes del petróleo, algunos hidrocarburos alifáticos como los alcanos se degradan rápidamente. Las estructuras ramificadas son más difíciles de degradar, también los dobles enlaces y los compuestos aromáticos presentan mayor resistencia a la biorremediación. Otros ejemplos son: aditivos de la gasolina como el metil, ter-butyl éter (MTBE) (Muñoz & Pacheco, 2017, pp. 18-20).

2.2.8.2. Temperatura

La temperatura es una medida del calor o energía térmica de las partículas en una sustancia. La temperatura no depende del número de partículas en un objeto y por lo tanto no depende de su tamaño (Miranda, 2015, p. 30).

La temperatura es importante en la degradación de los hidrocarburos, debido al crecimiento de las especies bacterianas siendo el rango óptimo de 10 a 45 °C, la actividad microbiana se reproduce cada 10 °C, siendo el rango óptimo para el proceso de biorremediación (Muñoz & Pacheco, 2017, pp. 18-20).

2.2.8.3. Valor de pH

El potencial de hidrógeno es una medida de acidez o alcalinidad de una sustancia, se define como el inverso del logaritmo de la actividad de iones Hidrógeno (Espinosa, 1999, p. 1).

Para mantener el crecimiento de los microorganismos degradadores de hidrocarburos, el pH del suelo debe tener valores en el rango de 6-8. Debido a que los valores de pH mayores a 6,5 proveen condiciones óptimas para la biorremediación, minimizan la solubilización y migración de los metales pesados. En el caso de que los suelos tuvieran valores de pH bajos se sugiere emplear cal como material estabilizante del suelo y en el caso de tener pH altos utilizar urea como material estabilizante del suelo. (Muñoz & Pacheco, 2017, pp. 18-20).

2.2.8.4. Oxígeno

El oxígeno es el aceptor final de electrones generalmente empleado en procesos biológicos y es necesario en determinados tipos de reacciones de óxido– reducción catalizada por enzimas. Los microorganismos, oxidan compuestos orgánicos o inorgánicos, obteniendo así la energía necesaria para su crecimiento (Suarez, 2013, p. 17).

Las reacciones de oxidación son las de mayor importancia en la biorremediación de los hidrocarburos, las condiciones aeróbicas se logran mediante el volteo ya sea mecánico con la ayuda de maquinaria agrícola o volteo manual en el caso de realizarlo en el laboratorio. El objetivo del volteo no es solo oxigenar el suelo, sino que además redistribuye los nutrientes, contaminantes y microorganismos (Muñoz & Pacheco, 2017, pp. 18-20).

2.2.8.5. Humedad

Es la determinación gravimétrica por diferencia de pesos, pesando la muestra antes de ser secada, y luego la muestra seca (Miranda, 2015, p. 30).

En un suelo que se encuentre en el proceso de biorremediación requiere de condiciones mínimas de humedad para el crecimiento bacteriano y debe tener valores entre 40-80 %, debido a que el exceso de humedad inhibirá el crecimiento bacteriano (Muñoz & Pacheco, 2017, pp. 18-20).

2.2.9. Fundamentación bioquímica de la biorremediación

Se basa series de reacciones de óxido-reducción, cuya finalidad es obtener energí, se producen en la cadena transportadora de electrones de células. La cadena la inicia un sustrato orgánico (compuestos hidrocarburos) que es externo a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia (Cando, 2011, p. 84).

Los aceptores más comunes utilizados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biorremediación serán de tipo aerobio, sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio (Cando, 2011, p. 84).

Esquema de reacciones:

2.2.9.1. Degradación aerobia



2.2.9.2. Degradación anaerobia

Según (Cando, 2011, p. 84) expone la siguiente formula:



2.2.10. Reglamento Ambiental para las operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador

Reglamento ambiental para las operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador. (RAOHE), (Decreto Ejecutivo 1215, Registro Oficial 265, 2001) la tabla trata de límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicio. “Tienen el propósito de establecer los niveles máximos de concentración de contaminantes de un suelo en proceso de remediación o restauración” (Cando, 2011, p. 44).

Tabla 1-2: Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de industria hidrocarburífera medidos en mg/kg.

Parámetro	Expresado en	Uso Agrícola	Uso Industrial	Ecosistemas Sensibles
Hidrocarburos Totales de Petróleo	TPH	< 2500	< 4000	< 1000
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	HAPs	< 2	< 5	< 1
Cadmio	Cd	< 2	< 10	< 1
Níquel	Ni	< 50	< 100	< 40
Plomo	Pb	< 100	< 500	< 80

Fuente: (Decreto Ejecutivo 1215, Registro Oficial 265, 2001) *Tabla 6 RAOHE.*

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1. Hipótesis y Variables

3.1.1. *Hipótesis General*

- El consorcio bacteriano conformado disminuirá la concentración de los contaminantes identificados en las muestras de suelos provenientes de la Estación Secoya por lo menos un 70%.

3.1.2. *Hipótesis Específicas*

- La muestra de suelo de la Estación de Secoya presenta altas concentraciones de contaminantes y presencia de microorganismos indígenas.
- En la muestra de suelo de la Estación de Secoya existe la presencia de microorganismos capaces de degradar compuestos orgánicos.

3.2. Identificación de Variables

3.2.1. *Variables dependientes*

- ✓ Temperatura.
- ✓ Potencial de Hidrógeno.
- ✓ Antagonismo bacteriano.
- ✓ Porcentaje de degradación
- ✓ Tiempo en que se disminuirá la mayor parte de concentración de contaminantes identificados en las muestras de suelos provenientes de la Estación Secoya.

3.2.2. Variables independientes

- ✓ Número de Bacterias con alto poder degradativo.
- ✓ Número o colonias de Bacterias con alta actividad emulsificante.
- ✓ Concentración de Contaminantes.

3.3. Matriz de consistencia

Tabla 2 - 3: Matriz de Consistencia

PROBLEMA GENERAL		OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	
<p>En nuestro país se ha ido incrementando la contaminación del suelo con hidrocarburos, afectando así al medio ambiente.</p> <p>Los hidrocarburos afectan las propiedades fisicoquímicas del suelo, como el pH, textura, y causan un impacto ambiental.</p> <p>Para aliviar esta problemática es necesario emplear el proceso de biorremediación de suelos contaminados utilizando un consorcio bacteriano capaz de degradar dichos contaminantes. (Cando, 2011, p. 23)</p>		<p>Obtener un consorcio bacteriano para biorremediar suelos contaminados, utilizando bacterias nativas aerobias.</p>	<p>El consorcio bacteriano conformado disminuirá la concentración de los contaminantes identificados en las muestras de suelos provenientes de la Estación Secoya por lo menos un 70 %.</p>	
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	VARIABLES ESPECÍFICAS	MÉTODO DE ANÁLISIS
<p>Es posible que la degradación de hidrocarburos presentes en el suelo contaminado de la Estación de Servicio de Secoya se vea afectada negativamente por la falta de nutrientes o por baja población microbiana</p>	<p>Caracterizar físico-química y microbiológicamente los suelos contaminados en base a la Normativa Ambiental Tabla 2. Anexo 2 del Libro VI del TULSMA y Tabla 6 del RAOHE-1215.</p>	<p>Con la caracterización físico-química y microbiológica de los suelos contaminados se pretenderá conocer si es un suelo apto para el proceso de biorremediación.</p>	<p>Comparación del suelo contaminado con la Normativa Ambiental Tabla 2. Anexo 2 del Libro VI del TULSMA y Tabla 6 del RAOHE-1215</p>	<p>Realización de la caracterización fisicoquímica del suelo contaminado.</p>

degradadora.				
Al no aplicar los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano, este no ayudará a asimilar todos los compuestos presentes en el suelo.	Seleccionar las cepas potenciales mediante las pruebas de emulsificación, degradativa y antagonismo para procesos de biorremediación y caracterizar el consorcio bacteriano desarrollando su producción.	Mediante la aplicación de varios nutrientes específicos, favorecerá el crecimiento microbiano degradando así los hidrocarburos en menor tiempo.	Activación de cepas bacterianas en caldo nutritivo y adición de petróleo.	Elaboración del Inóculo.
Si no se caracteriza el consorcio bacteriano se podría estar trabajando con organismos patógenos y que no presenten características apropiadas para procesos de biorremediación.	Sembrar las bacterias en el suelo y al suelo remediado verificar si cumple con las Normativas Ambientales Tabla 3. Anexo 2 del Libro VI del TULSMA y tabla 6 del RAOHE-1215.	Con la caracterización del consorcio bacteriano se identificarán microorganismos inocuos para degradar compuestos orgánicos como son los hidrocarburos totales de petróleo.	Actividad emulsificante. Poder degradativo. Prueba Antagonismo.	Prueba de Actividad emulsificante. Prueba Poder degradativo. Prueba Antagonismo.
No conocer el porcentaje de degradabilidad que presente el consorcio bacteriano al suelo contaminado.	Definir el porcentaje de degradabilidad que presenta el consorcio bacteriano aislado.	Al someter al suelo contaminado al proceso de biorremediación mediante la técnica de bioaumentación se puede definir el porcentaje de degradabilidad de TPH.	Concentración de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH).	Equipo cromatógrafo de gases.

Realizado por: Paola Rodríguez, 2018

3.4. Tipo y diseño de la investigación

El tipo de investigación es explicativa porque relaciona las variables dependientes e independientes y trata de explicar el comportamiento de las variables. El diseño de la investigación es experimental, se basa en la realización de las variables permitiendo desarrollar hipótesis y de los resultados se obtiene una información que corrobora con el descubrimiento de un nuevo hecho o confirma los ya existentes.

3.4.1. Esquema del proceso

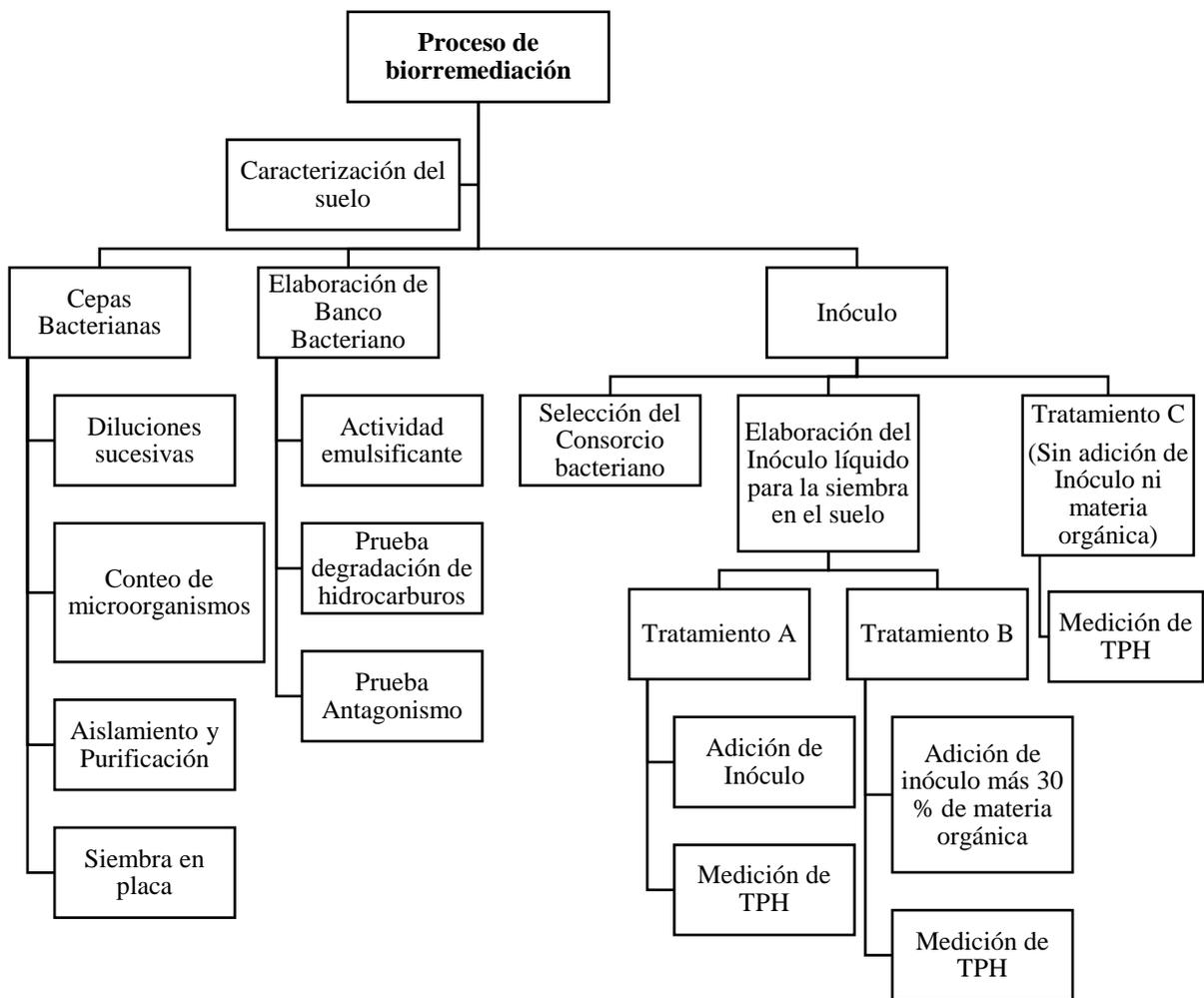


Figura 3-3 Esquema del proceso de biorremediación.

Realizado por: Rodríguez Paola, 2018.

3.4.2. Distribución de unidades experimentales

Para la biorremediación de suelos contaminados se estableció 3 Tratamientos: A, B y C, cada tratamiento con 3 réplicas.

3.5. Unidad de análisis

La unidad de análisis para este proyecto de Investigación es de 1 Kg de suelo contaminado por tratamiento y réplica.

3.6. Población de estudio

La población de estudio es el área contaminada con una extensión de 1760.512 m². (Revelo & Montesdeoca, 2015, p. 27)

3.7. Tamaño de muestra

El tipo de muestreo a utilizarse será, un muestreo aleatorio simple, para determinar el tamaño de la muestra contaminada con hidrocarburos y se utilizará la siguiente fórmula: Ecuación1, la misma que se aplica al conocer el tamaño de la población.

Ecuación 1:

$$n = \frac{Z^2 * p * q * N}{N * E^2 + Z^2 * p * q}$$

Dónde:

N=Tamaño de la Población =1760.512 m²

Z =Nivel de Confianza (del 95% es 1.96)

E=Error o precisión =5%

p= proporción esperada (en este caso 5%=0.05)

q= 1-p (en este caso 1-0.05 = 0.95)

n=Tamaño de la Muestra

$$n = \frac{1.96^2 * 0.05 * 0.95 * 1760.512}{1760.5126 * 0.05^2 + 1.96^2 * 0.05 * 0.95}$$

$$n = 71$$

3.8. Selección de muestra

En la Estación Secoya los técnicos encargados tomaron de forma aleatoria 71 muestras simples de suelo de 126 g aproximadamente, formando una muestra compuesta de 1 kg, por cada tratamiento dando un total 9 muestras compuestas de 1 kg con su tres respectivas réplicas.

En el laboratorio se procedió a tomar la muestra bajo el procedimiento de cuarteo: se homogenizó la muestra, se realizó un cuarteo tomando las esquinas del suelo y se repitió el procedimiento hasta obtener una muestra representativa (Miranda, 2015, p. 27).

3.8.1. Lugar de investigación

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA) perteneciente a la Facultad de Ciencias.

Con 2756 m.s.n.m. Cuenta con una temperatura promedio de 15 °C - 25 °C, humedad relativa promedio de 30 - 60% y una presión atmosférica de 540 mm Hg. (Miranda Freire, 2015, p. 6).

3.8.2. Ubicación del área contaminada

Estación Secoya

Está ubicada dentro del Campo Secoya, la cual forma parte del área Libertador, perteneciente a la provincia de Sucumbíos, en el nororiente de la Amazonía Ecuatoriana (Revelo & Montesdeoca, 2015, p. 27).

Esta estación de producción se encuentra direccionado el fluido proveniente de algunos pozos para ser separado, tratado y almacenado. La Estación Secoya maneja un promedio de 22745 BFPD, dispone de tres tanques que almacena petróleo enviando a las estaciones Pichicha, Shuara, Shushuqui y Terete (Jiménez & Paucar, 2011).

La estación Secoya posee un área de 18950 ft². (Revelo & Montesdeoca, 2015, p. 27) Además, en la tabla 2-3, se presentan las siguientes coordenadas de la Estación Secoya:

Tabla 3-3: Coordenadas de la Estación Secoya

Puntos de GPS Navegador		
Norte (m)	Este (m)	Cota (m)
1 001 334	322 965	295

Fuente: (Revelo & Montesdeoca, 2015, p. 27)



Figura 4-3: Mapa geográfico de la Estación Secoya

Fuente: (Revelo & Montesdeoca, 2015, p. 27)

3.9. Diseño aplicado

Para este proceso de biorremediación se utilizó la técnica de bioaumentación y se realizó diferentes pruebas para la selección y obtención del consorcio bacteriano aerobio nativo desarrollado a escala de laboratorio.

Se dividió en tres tratamientos diferentes: tratamiento A, B y C, cada uno con sus 3 repeticiones biológicas. Para el tratamiento A: se adicionó 500 mL de inóculo. Para el tratamiento B: se adicionó 500 mL de inóculo más el 30 % de materia orgánica (150 gramos de aserrín y 150 gramos de cáscara de limones), finalmente para el tratamiento C: no se adicionó inóculo ni materia orgánica.

Tabla 2-3: Aplicación de tratamientos

Tratamientos	Adición	Número de repeticiones
Tratamiento A	Inóculo de 500 mL	3
Tratamiento B	Inóculo de 500 mL +30 % de materia orgánica	3
Tratamiento C	Sin adición de ningún tratamiento (degradación natural)	3

Realizado por: Paola Rodríguez, 2018

3.10. Proceso experimental

3.10.1. Determinación de hidrocarburos totales de petróleo

Equipos:

- ✓ Agitador mecánico (LCEI-0092)
- ✓ Limpiador ultrasónico (LCEI-0096)
- ✓ Centrífuga (LCEI-0097)
- ✓ Estufa
- ✓ Cromatógrafo de gases

Materiales:

- ✓ Espátula
- ✓ Mortero
- ✓ Cernidor
- ✓ Tubo de ensayo
- ✓ Pipeta

Reactivos:

- ✓ Hexano y diclohexano
- ✓ Sílica gel

Procedimiento:

Se pesó una muestra de suelo, se dejó secar por 24 horas, posteriormente se trituro la muestra con la ayuda de un mortero y se procedió a cernir. Luego se pesó la muestra cernida (2.0008 g) y se colocó en un tubo de ensayo, se añadió hexano y diclohexano y se agitó por 10 segundos.

Luego se colocó en el limpiador ultrasónico, se retiró la muestra y se esperó que se enfríe, se centrifugó la muestra por 10 segundos, se añadió sílica gel y nuevamente se agitó y centrifugó. Se aplicó el factor 10 con la ayuda de la micropipeta y pipeta. Se colocó en un envase de vidrio ámbar 2 mL de esta mezcla y finalmente se observó en el Equipo cromatógrafo de gases (Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental, CESTTA, 2018).

3.10.2. Determinación de cadmio, níquel, plomo.

Equipos:

- ✓ Balanza analítica (LCEI-232)
- ✓ Plancha de calentamiento (LCEI-0181-3)
- ✓ Lavador de gases (B-414)
- ✓ Digestor (K-439)
- ✓ Destilador (K-355)
- ✓ Equipo plasma acoplado inductivamente (ICP) (LCEI-200)

Materiales:

- ✓ Mortero
- ✓ Papel filtro
- ✓ Matraz de 125 mL
- ✓ Pipeta
- ✓ Balón de 50 mL

Reactivos:

- ✓ Ácido nítrico (HNO_3)
- ✓ Agua oxigenada (H_2O_2)

Procedimiento:

Se pesó una muestra de suelos contaminado y se secó por 24 horas, luego se trituroó y se cernió.

Se pesó en la balanza analítica 2.0003 g de la muestra de suelo cernida y también se pesó la cápsula, luego se procedió a pesar 10.0075 g de muestra de suelo cernida. Los 2.0003 g se llevó al proceso de digestión por plancha: se colocó en un matraz los 2.0003 g y se agregó ácido nítrico, se colocó en la plancha de calentamiento y se dejó reposar. Luego de que esté frío se añadió agua oxigenada, y se colocó en la plancha de calentamiento, se enfrió, filtró y se aforó en un balón de 50 mL. Finalmente se midió en el equipo ICP (Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente). (Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental, CESTTA, 2018).

3.10.3. Determinación del nitrógeno

Equipos:

- ✓ Lavador de gases (B-414)
- ✓ Digestor (K-439)
- ✓ Destilador (K-355)
- ✓ Balanza analítica (LCEI-232)

Materiales:

- ✓ Tubo de ensayo

Procedimiento:

Con la muestra de suelo cernido (10.0075 g) se pesó en la balanza Analítica 1g y se colocó en un tubo de ensayo para llevarlo al lavador de gases, se digestó y destiló. (Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental, CESTTA, 2018).

3.10.4. Determinación del pH

Equipos:

- ✓ Agitador mecánico (LCEI-0092)
- ✓ pHmetro (LCEI-0031)
- ✓ Balanza analítica (LCEI-232)

Materiales:

- ✓ Envase microbiológico

Procedimiento:

Se pesó 10 gramos de suelo contaminado en la balanza analítica colocándolo en un envase microbiológico. Luego se añadió agua destila, se procedió agitarlo y se midió el pH.

3.10.5. Determinación de la humedad

Equipos:

- ✓ Balanza de Humedad (LCEI-123)
- ✓ Balanza analítica (LCEI-232)

Procedimiento:

Se pesó 1.129 gramos de suelo contaminado en la balanza analítica, luego se colocó en la Balanza de Humedad se esperó aproximadamente 30 minutos y se leyó el resultado.

3.10.6. Determinación de la concentración bacteriana, mediante la técnica de diluciones sucesivas.**Equipos:**

- ✓ Cabina de Flujo Laminar Horizontal (LCEI-0070)
- ✓ Agitador de Plancha (LCEI-104)
- ✓ Incubadora (LCEI-0087)
- ✓ Balanza analítica (LCEI-232)

Materiales:

- ✓ Láminas Petrifilm
- ✓ Tubos de ensayo
- ✓ Fundas Ziploc

Reactivos:

- ✓ Agua de Peptona (Buffered Peptone Water)
- ✓ Etanol
- ✓ Agua destilada

Procedimiento:

Se esterilizó el área de trabajo con la ayuda del etanol, se pesó 10 gramos de suelo contaminado en la balanza analítica, en una funda plástica estéril se añadió los 10 gramos y 90 mL de Agua peptona y se procedió agitarlo por 15 minutos.

Se cogió 1 mL de la solución madre y se añadió 1 mL al tubo de ensayo 10^{-2} y con la ayuda de la pipeta se pasó al tubo 10^{-3} , se realizó este procedimiento sucesivamente hasta el tubo de ensayo 10^{-7} . Posteriormente se agregó 1 mL de estos tubos seleccionados y se pasó a las láminas Petrifilm y luego se incubó a 35 °C por 48 horas. (Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental, CESTTA, 2018).

3.10.7. Siembra en placa

Equipos:

- ✓ Cámara de flujo laminar Horizontal (LCEI-0070)
- ✓ Autoclave (LCEI-0001)
- ✓ Incubadora (LCEI-0087)
- ✓ Balanza analítica (LCEI-232)

Materiales:

- ✓ Cajas Petri
- ✓ Pipeta automática 0.1 mL (LCEI-0178-02)
- ✓ Cinta Petrifilm

Reactivos:

- ✓ Agar nutritivo (Nutrient Agar)

Procedimiento:

Se preparó agar nutritivo previamente esterilizado en la autoclave y se dispó en cajas Petri, se dejó enfriar, se agregó las diluciones en cada una de las cajas Petri, finalmente se selló las cajas Petri con cinta Petrifilm y se incubó a 35 °C por 48 horas. (Miranda, 2015, p. 17)

3.10.8. Aislamiento y purificación de las cepas bacterianas

Equipos:

- ✓ Cámara de flujo laminar Horizontal (LCEI-0070)
- ✓ Autoclave (LCEI-0001)
- ✓ Incubadora (LCEI-0087)

Materiales:

- ✓ Cajas Petri
- ✓ Pipeta automática
- ✓ Cinta Petrifilm
- ✓ Frascos de vidrio con tapa rosca

- ✓ Gradilla
- ✓ Lámpara de alcohol
- ✓ Asa bacteriológica

Reactivos:

- ✓ Agar nutritivo (Nutrient Agar)

Procedimiento:

Previamente se esterilizó el área de trabajo, se preparó el agar nutritivo y se colocó en cajas Petri hasta que se solidificaron. Luego se procedió a inocular con la ayuda del asa bacteriológica en las nuevas cajas Petri con agar nutritivo y se incubó por 48 horas a una temperatura de 35 °C.

Se repitió este proceso hasta que se observó una uniformidad en todas las colonias aisladas. Luego de las 48 horas de incubación se comparó, clasificó y seleccionó las muestras. Finalmente se identificó las cepas por el color y forma. (Miranda, 2015, p. 17)

3.10.9. Siembra de las cepas bacterianas

Equipos:

- ✓ Cámara de flujo laminar Horizontal (LCEI-0070)
- ✓ Autoclave (LCEI-0001)
- ✓ Incubadora (LCEI-0087)
- ✓ Materiales:
- ✓ Cajas Petri
- ✓ Pipeta automática
- ✓ Cinta Petrifilm
- ✓ Frascos de vidrio con tapa rosca
- ✓ Gradilla
- ✓ Lámpara de alcohol
- ✓ Asa bacteriológica

Reactivos:

- ✓ Agar nutritivo (Nutrient Agar)

Procedimiento:

Se esterilizó la cámara de flujo laminar, se preparó el agar nutritivo, se esterilizó en el equipo autoclave y se dispó en cajas Petri hasta que se solidificó, con ayuda del asa bacteriológica se procedió a inocular en las nuevas cajas Petri con agar y finalmente se incubó por 48 horas a 35°C. Este proceso se repitió hasta que se observó una uniformidad total en todas las colonias aisladas. (Miranda, 2015, p. 17)

3.10.10. Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas bacterianas**Equipos:**

- ✓ Cámara de flujo laminar Horizontal (LCEI-0070)
- ✓ Autoclave (LCEI-0001)
- ✓ Microscopio

Materiales:

- ✓ Porta objetos
- ✓ Lámpara de alcohol

Reactivos:

- ✓ Cristal violeta
- ✓ Lugol
- ✓ Alcohol acetona
- ✓ Safranina
- ✓ Aceite de inmersión

Procedimiento:

Se observó las cajas Petri donde se encontraban las cepas ya sembradas se cogió con un asa bacteriológica esterilizada una muestra de las colonias de cada una de las cajas Petri y se extendió sobre el portaobjetos, se dejó secar y posteriormente se agregó el Cristal violeta, Lugol, el alcohol acetona y Safranina sobre el portaobjetos. Luego se agregó el aceite de inmersión y se observó en el microscopio con el lente de 100 X. Finalmente se registró las características microscópicas. (Miranda, 2015, pp. 18-19)

3.10.11. Elaboración de bancos bacterianos

Equipos:

- ✓ Incubadora (LCEI-0087)
- ✓ Autoclave (LCEI-0001)

Materiales:

- ✓ Pipeta automática de 1 mL y 5 mL
- ✓ Micropipeta
- ✓ Puntas de 1 mL y 5 mL
- ✓ Tubos eppendorf
- ✓ Tubos de ensayo con tapas
- ✓ Asa bacteriológica

Reactivos:

- ✓ Agar nutritivo (Nutrient Agar)
- ✓ Caldo Nutritivo (Nutrient Broth)
- ✓ Glicerol (300 mL)

Procedimiento:

Se preparó el caldo nutritivo y caldo nutritivo más glicerol se colocó en tubos de ensayo, posteriormente se esterilizó en el equipo autoclave junto con los tubos eppendorf y puntas de 1 y 5 mL. Después se cogió con la ayuda del asa bacteriológica las cepas que se encontraban en cada caja Petri y se suspendió en los tubos de ensayo que contenían solo el caldo nutritivo, se tapó los tubos, se rotuló e incubó por 48 horas.

Luego se procedió a mezclar los tubos de ensayo incubados con los tubos de caldo nutritivo con glicerol y se dosificó en tubos eppendorf, después se colocó en fundas ziploc, se rotuló el código de cepa, número de viales y con el nombre del suelo que correspondía, en este caso estación Secoya y se congeló para su próxima utilización. (Miranda, 2015, p. 20).

3.10.12. Actividad emulsificante

Equipos:

- ✓ Cámara de flujo laminar Horizontal (LCEI-0070)
- ✓ Autoclave (LCEI-0001)
- ✓ Incubadora (LCEI-0087)
- ✓ Agitador Shaker (LECI-261)
- ✓ Centrífuga (LCEI-0097)
- ✓ Espectrofotómetro (LCEI-O231)
- ✓ Agitador (LCEI-0092)

Materiales:

- ✓ Matraces de 100 mL
- ✓ Matraz de 1000 mL
- ✓ Pipeta automática (100 – 1000 uL)
- ✓ Probeta de 100 mL
- ✓ Cinta Parafilm

Procedimiento:

Se preparó el medio mínimo en un matraz de 1000 mL y junto con otros matraces de 100 mL y la probeta se esterilizó en el equipo autoclave. Luego se preparó el caldo nutritivo, se esterilizó y enfrió. Se procedió reactivar las cepas bacterianas en 2 mL de caldo nutritivo, se incubó a 35°C por 24 horas, se pasó a matraces de 100 mL el caldo nutritivo con las cepas reactivadas y el medio mínimo, después se selló los matraces con cinta Parafilm, se enumeró y se agitó constantemente por 72 horas.

Luego se centrifugó por treinta minutos, se adicionó petróleo crudo a los tubos que contenían sobrenadante, se procedió agitarlo por 5 minutos luego se leyó la absorbancia a 540 nm de longitud de onda. La absorbancia leída se convirtió en unidades de actividad emulsificante por mililitro (UAE/ mL), siendo 0.816 de absorbancia equivalente a una unidad de actividad emulsificante por mililitro. (Miranda, 2015, pp. 21-22)

3.10.13. Prueba de degradación de hidrocarburos

Equipos:

- ✓ Cámara de flujo laminar Horizontal (LCEI-0070)

- ✓ Agitador Shaker (LECI-261)
- ✓ Espectrofotómetro (LCEI-O231)

Materiales:

- ✓ Matraces de 100 mL
- ✓ Tubos de ensayo con sus respectivas tapas
- ✓ Pipetas automáticas de 100 uL y 1 mL

Reactivos:

- ✓ Escala de Mc. Farland

Procedimiento:

Se reactivó las cepas bacterianas en 2 mL de caldo nutritivo estéril en los tubos de ensayo y se incubó por 24 horas, posteriormente se preparó el medio mineral, se trasvasó los 18 mL del medio mineral en los matraces, se esterilizó y se enfrió. Luego se añadió petróleo crudo más el caldo nutritivo a cada matraz, se agitó por 30 días a una temperatura aproximada de 30 °C con la ayuda de una lámpara infrarroja.

Después se verificó la turbidez formada en el medio de cultivo que contenían los matraces, se realizó las lecturas en el espectrofotómetro y se comparó la turbidez formada que contenían los matraces comparando con la escala de Mc. Farland. (Miranda, 2015, pp. 23-24)

3.10.14. Prueba de antagonismo

Equipos:

- ✓ Autoclave (LCEI-0001)
- ✓ Cámara de flujo laminar Horizontal (LCEI-0070)
- ✓ Materiales:
- ✓ Cajas Petri
- ✓ Sorbetes
- ✓ Pinza
- ✓ micropipeta

Reactivos:

- ✓ Agar nutritivo (Nutrient Broth)
- ✓ Caldo nutritivo

Procedimiento:

Se reactivó las cepas bacterianas, después se preparó el agar nutritivo y se esterilizó para colocar en las cajas Petri.

En cada caja Petri se sembró una cepa bacteriana y con una pinza esterilizada se colocó pequeños trozos de sorbetes sobre la caja Petri con agar y se rotuló al reverso de las cajas Petri el número correspondiente de cada una de las cepas bacterianas. Con la ayuda de una micropipeta se dosificó las otras cepas bacterianas en el interior de cada uno de los sorbetes y finalmente se selló e incubó las cajas Petri por 24 horas a 35 °C. (Miranda, 2015, p. 26)

3.10.15. Preparación del Inóculo Bacteriano para la Siembra en el suelo

Equipos:

- ✓ Autoclave (LCEI-0001)
- ✓ Cámara de flujo laminar Horizontal (LCEI-0070)
- ✓ Materiales:
- ✓ Matraz Erlenmeyer 2000 mL
- ✓ Manguera para oxigenar peceras
- ✓ Motor de pecera
- ✓ Algodón

Procedimiento:

Se Activó las cepas bacterianas (aquellas que forman el consorcio bacteriano) en 5 mL de caldo nutritivo se incubó por 24 horas, después se preparó el medio mínimo y se esterilizó.

En un matraz Erlenmeyer se añadió el medio mínimo más las cepas bacterianas activadas, se colocó la manguera se conectó al motor para que se oxigene y se tapó con algodón, dejándolo por 24 horas. Finalmente se colocó en el suelo contaminado con hidrocarburo. (Cazorla, 2014, p. 94).

3.10.16. Preparación del Suelo con el Tratamiento A

Equipos:

- ✓ Balanza analítica (LCEI-232)

Materiales:

- ✓ Táper plástico
- ✓ 1 kg de suelo contaminado

Reactivos:

- ✓ Inóculo (500 mL)

Procedimiento:

Se pesó 1 kg de suelo contaminado, se homogenizó y se humedeció con los 250 mL de inóculo. Después de 29 días se añadió otra cantidad de 250 mL para completar con los 500 mL de inóculo. Para el proceso de biorremediación se dio aireación manual mediante volteo. Se colocó el táper plástico en un lugar claro, a una temperatura ambiente y finalmente se repitió este proceso en las 3 repeticiones correspondientes al tratamiento A.

3.10.17. Preparación del Suelo con el Tratamiento B

Equipos:

- ✓ Balanza analítica (LCEI-232)

Materiales:

- ✓ Táper plástico
- ✓ 1 kg de suelo contaminado
- ✓ 300 g materia orgánica

Reactivos:

- ✓ Inóculo (500 mL)

Procedimiento:

Se pesó 1 kg de suelo contaminado, se añadió 250 mL de inóculo. Posteriormente se mezcló 150 gramos de cáscaras de limón y 150 gramos de aserrín, dando una relación del 30 % del total de materia orgánica y se homogenizó para que exista una apropiada aireación. Después de 29 días se añadió otra cantidad de 250 mL para completar con los 500 mL de inóculo.

Se colocó el táper plástico en un lugar claro, a una temperatura ambiente y finalmente se repitió este proceso en las 3 repeticiones correspondientes al tratamiento B.

3.10.18. Preparación del Suelo con el Tratamiento C

Equipos:

- ✓ Balanza analítica (LCEI-232)

Materiales:

- ✓ Táper plástico
- ✓ 1 kg de suelo contaminado

Reactivos:

- ✓ Agua

Procedimiento:

Se pesó 1 kg de suelo contaminado, se humedeció con agua y se homogenizó para que exista una apropiada aireación. Se colocó el táper plástico en un lugar claro, a una temperatura ambiente y finalmente se repitió este proceso en las 3 repeticiones correspondientes al tratamiento C.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis de Resultados

4.1.1. Caracterización del suelo

Tabla 1-4: Resultado de la Caracterización del suelo.

Parámetro	Resultado	Unidad
TPH	53696,27	mg/kg
pH	7,80	
Metales Pesados		
Cadmio	1,70	mg/kg
Níquel	6,30	mg/kg
Plomo	10,00	mg/kg
Nutrientes		
Nitrógeno	0,92	%

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018

Se realizó la caracterización inicial del suelo contaminando, se determinó que los Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH) presentó contaminación, superando los límites permisibles con un valor de 51196.27 mg/ kg para uso de suelo agrícola, de acuerdo con la Tabla 6 del RAOHE-1215.

El pH del suelo es de 7,8 según (Martínez, 2001, p. 14), los hidrocarburos afectan las propiedades fisicoquímicas del suelo, sin embargo, tanto la conductividad y pH no presentan mayor variación.

La concentración del resultado de los metales Cd, Ni, Pb se encontraron bajo la norma de la Tabla 3. Anexo 2, Libro VI del TULSMA. También se caracterizó el Nitrógeno, existiendo una buena cantidad de nutriente.

4.1.2. Caracterización Macroscópica y Microscópica

Tabla 2-4: Resultado de Caracterización Macroscópica de las cepas bacterianas.

Número de Cepa	Color	Borde	Forma
1	Blanco	Redondeado	Regular
2	Blanco	Redondeado	Irregular
3	Blanco	Redondeado	Regular
4	Blanco	Redondeado	Irregular
5	Blanco	Ondulado	Irregular
6	Blanco	Redondeado	Regular
7	Blanco	Redondeado	Regular
8	Blanco	Redondeado	Regular
9	Blanco	Redondeado	Regular
10	Blanco	Redondeado	Regular
11	Blanco	Ondulado	Irregular
12	Blanco	Redondeado	Irregular
13	Blanco	Ondulado	Regular
14	Blanco	Ondulado	Regular
15	Blanco	Redondeado	Regular
16	Blanco	Ovalado	Regular
17	Blanco	Redondeado	Regular
18	Blanco	Redondeado	Regular
19	Blanco	Redondeado	Irregular
20	Blanco	Ondulado	Irregular
21	Blanco	Ondulado	Irregular
22	Blanco	Redondeado	Regular
23	Blanco	Ondulado	Irregular
24	Blanco	Redondeado	Fusiforme
25	Blanco	Redondeado	Regular
26	Blanco	Redondeado	Regular
27	Blanco	Redondeado	Regular
28	Blanco	Filamentoso	Rizoide
29	Blanco	Ondulado	Regular
30	Morado	Redondeado	Circular
31	Amarillo	Redondeado	Regular
32	Blanco	Redondeado	Regular
33	Amarillo	Redondeado	Regular

34	Blanco	Redondeado	Regular
35	Amarillo	Redondeado	Regular
36	Amarillo	Redondeado	Irregular
37	Blanco	Redondeado	Regular
38	Blanco	Redondeado	Regular
39	Amarillo	Redondeado	Regular
40	Blanco	Redondeado	Regular
41	Amarillo	Redondeado	Regular
42	Amarillo	Redondeado	Irregular
43	Blanco	Redondeado	Irregular
44	Blanco	Redondeado	Irregular
45	Blanco	Ondulado	Irregular
46	Blanco	Ondulado	Irregular
47	Blanco	Ondulado	Regular
48	blanco	Filamentoso	Regular
49	Blanco	Ondulado	Irregular
50	Blanco	Ondulado	Irregular
51	Blanco	Ondulado	Irregular
52	Blanco	Redondeado	Regular
53	Blanco	Ondulado	Irregular
54	Blanco	Redondeado	Irregular
55	Blanco	Redondeado	Regular
56	Blanco	Redondeado	Irregular
57	Blanco	Ondulado	Irregular
58	Blanco	Redondeado	Regular
59	Blanco	Redondeado	Regular
60	Blanco	Ondulado	Irregular
61	Blanco	Ondulado	Irregular
62	Blanco	Ondulado	Irregular
63	Blanco	Ondulado	Regular
64	Blanco	Ondulado	Irregular
65	Blanco	Redondeado	Irregular
66	Blanco	Redondeado	Irregular
67	Blanco	Ondulado	Irregular
68	Blanco	Redondeado	Irregular
69	Blanco	Redondeado	Irregular
70	Blanco	Ondulado	Irregular
71	Amarillo	Redondeado	Regular

72	Amarillo	Redondeado	Regular
73	Blanco	Redondeado	Irregular
74	Blanco	Redondeado	Regular
75	Blanco	Redondeado	Irregular
76	Blanco	Redondeado	Irregular
77	Blanco	Redondeado	Regular

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018

4.1.2.1. Resultado de Caracterización Microscópica de las 51 cepas bacterianas

Tabla 3-4: Gram-Positivas.

Número de Cepa	Forma Celular	Esporulación
3	Bacilo	Si
4	Bacilo	Si
5	Bacilo	Si
8	Bacilo	No
9	Bacilo	Si
10	Bacilo	Si
11	Bacilo	Si
12	Bacilo	No
14	Bacilo	Si
15	Coco	Si
16	Bacilo	Si
17	Bacilo	Si
18	Bacilo	Si
19	Coco	Si
20	Coco	Si
22	Bacilo	Si
23	Bacilo	Si
24	Coco	Si
25	Coco	Si
26	Bacilo	Si
27	Bacilo	Si
29	Bacilo	Si
30	Bacilo	Si
34	Coco	Si
35	Coco	Si

36	Bacilo	Si
37	Bacilo	Si
39	Bacilo	Si
40	Bacilo	Si
42	Bacilo	Si
43	Bacilo	No
44	Bacilo	No
46	Bacilo	No
47	Bacilo	No
48	Bacilo	Si
49	Bacilo	Si
51	Bacilo	Si

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018

Tabla 4-4: Gram-Negativas.

Número de Cepa	Forma Celular	Esporulación
1	Bacilo	Si
2	Bacilo	Si
6	Bacilo	Si
7	Coco	Si
13	Bacilo	No
21	Coco	Si
28	Bacilo	Si
31	Bacilo	Si
32	Bacilo	No
33	Bacilo	Si
38	Bacilo	Si
41	Bacilo	Si
45	Bacilo	Si
50	Bacilo	Si

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018

Al observar las características macroscópicas de las 77 cepas bacterianas, se pudo verificar que 26 cepas se encontraban repetidas debido a su color, forma y bordes idénticos, teniendo así un total de 51 cepas bacterianas puras y no repetidas las cuales serán aptas para la caracterización microscópica. En las cuales se observó que las cepas bacterianas presentaron en su mayoría color blanco, y además algunas de color amarillo y una de color morado. En cuanto a su forma era

variada ya que en su mayoría eran regulares, irregulares y fusiforme, en cuanto a su borde eran redondeados, ovalados y filamentosos, con tamaño variado. Al realizar la observación microscópica se determinó que las 51 cepas bacterianas aisladas presentaban en su mayoría con 37 Gram + y 14 Gram -, también presentaban 43 esporulación y 8 de ellas no, su forma celular de tipo Bacilo son 42 y 9 de tipo Cocco. Como se puede observar en las tablas 3-4 y 4-4. La caracterización macroscópica y microscópica permite verificar que no existan contaminaciones de las cepas bacterianas.

4.1.3. Prueba de Emulsificación

Tabla 5-4: Resultado de la Actividad Emulsificante

Número de Cepa	Absorbancia	Factor de conversión	UAE/mL
1	0.584	0.584 / 0.816	0.7157
2	1.298	1.298 / 0.816	1.5907
3	0.501	0.501 / 0.816	0.6140
4	0.718	0.718 / 0.816	0.8799
5	1.047	1.047 / 0.816	1.2831
6	0.729	0.729 / 0.816	0.8933
7	0.998	0.998 / 0.816	1.2230
8	0.708	0.708 / 0.816	0.8676
9	0.501	0.501 / 0.816	0.6139
10	0.809	0.809 / 0.816	0.9914
11	1.844	1.844 / 0.816	2.2598
12	1.210	1.210 / 0.816	1.4828
13	1.203	1.203 / 0.816	1.4742
14	2.342	2.342 / 0.816	2.8700
15	2.234	2.234 / 0.816	2.7377
16	1.069	1.069 / 0.816	1.3100
17	2.319	2.319 / 0.816	2.8419
18	1.415	1.415 / 0.816	1.7340
19	1.687	1.687 / 0.816	2.0674
20	0.714	0.714 / 0.816	0.2100
21	1.702	1.702 / 0.816	2.0857
22	0.707	0.707 / 0.816	0.8664
23	0.974	0.974 / 0.816	1.1936
24	1.695	1.695 / 0.816	2.0772
25	0.454	0.454 / 0.816	0.5563

26	1.277	1.277 / 0.816	1.5649
27	1.567	1.567 / 0.816	1.9203
28	1.538	1.538 / 0.816	1.8848
29	0.774	0.774 / 0.816	0.9485
30	0.622	0.622 / 0.816	0.7622
31	0.723	0.723 / 0.816	0.8860
32	0.802	0.802 / 0.816	0.9828
33	1.506	1.506 / 0.816	1.8455
34	0.342	0.342 / 0.816	0.4191
35	2.748	2.748 / 0.816	3.3676
36	0.532	0.532 / 0.816	0.6519
37	0.379	0.379 / 0.816	0.4644
38	1.222	1.222 / 0.816	1.4975
39	1.595	1.595 / 0.816	1.9546
40	2.129	2.129 / 0.816	2.6090
41	0.710	0.710 / 0.816	0.8700
42	0.778	0.778 / 0.816	0.9534
43	1.230	1.230 / 0.816	1.5073
44	1.556	1.556 / 0.816	1.9068
45	1.102	1.102 / 0.816	1.3504
46	1.765	1.765 / 0.816	2.1629
47	0.289	0.289 / 0.816	0.3541
48	0.952	0.952 / 0.816	1.1666
49	1.974	1.974 / 0.816	2.4191
50	2.172	2.172 / 0.816	2.661
51	1.567	1.567 / 0.816	1.9203

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018

Una vez leída la absorbancia de cada cepa bacteriana se procedió a convertir en unidades de actividad emulsificante por mililitro (UAE/mL), siendo 0.816 de absorbancia equivalente a una unidad de actividad emulsificante por mililitro. (Miranda, 2015, p. 32)

Las cepas N° 2,11,14,15,17,19,21,24,26,27,28,33,35,38,39,40,43,44,46,49,50, 51 tienen un poder emulsificante desde 1,5 a 3,4 UAE/mL con un total de 22 cepas, tal como se observa en la tabla 5-4, por lo tanto estas cepas tienen la capacidad de producir emulsificantes de petróleo y se conservaron para la siguiente prueba.

Las cepas que poseían actividad emulsificante menores a 1,5 no se utilizaron para la realización de la prueba de degradación de hidrocarburos. Esta prueba sirve para evaluar la capacidad que tienen las bacterias de producir emulsificantes de petróleo (Miranda, 2015, p. 32).

Tabla 6-4: Resultado de la Prueba Degradación de Hidrocarburos de acuerdo con la turbidez medida en la escala Mc. Farland.

Número de Cepa	Turbidez	Población aproximada
11	+3	9x10 ⁸ UFC/mL
14	+6	18x10 ⁸ UFC/mL
15	+3	9x10 ⁸ UFC/mL
17	+6	18x10 ⁸ UFC/mL
18	+3	9x10 ⁸ UFC/mL
19	+3	9x10 ⁸ UFC/mL
21	+6	18x10 ⁸ UFC/mL
24	+6	18x10 ⁸ UFC/mL
26	+5	15x10 ⁸ UFC/mL
27	+6	18x10 ⁸ UFC/mL
28	+6	18x10 ⁸ UFC/mL
33	+3	9x10 ⁸ UFC/mL
35	+3	9x10 ⁸ UFC/mL
38	+3	9x10 ⁸ UFC/mL
39	+5	15x10 ⁸ UFC/mL
40	+3	9x10 ⁸ UFC/mL
43	+3	9x10 ⁸ UFC/mL
44	+3	9x10 ⁸ UFC/mL
46	+3	9x10 ⁸ UFC/mL
49	+3	9x10 ⁸ UFC/mL
50	+3	9x10 ⁸ UFC/mL
51	+6	18x10 ⁸ UFC/mL

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018

Se obtuvo los resultados de la prueba de degradación de hidrocarburos las cepas N.º 26, 39 presentaron una turbidez según la escala Mc. Farland de +5 y se obtuvo una población aproximada de 15x10⁸ UFC/mL indicando un crecimiento muy bueno al igual que las cepas N.º 14,17,21,24,27,28,51 con una turbidez según la escala Mc. Farland de +6 se obtuvo una población

aproximada de 18×10^8 UFC/mL y el resto de las cepas presentaron una turbidez según la escala McFarland de +3, con una población aproximada de 9×10^8 UFC/mL indicando un crecimiento bueno. Se seleccionaron todas las cepas ya que presentan un crecimiento bacteriano bueno (+3) y muy bueno (+5, +6) y no se presentó ningún crecimiento regular (+2) como se puede observar en la tabla 6-4 (Miranda, 2015, p. 33).

4.1.4. Prueba de Antagonismo

Tabla 7-4: Resultado de la prueba de Antagonismo

Número de Cepa	Antagónica
11	Si
14	Si
15	Si
17	No
18	Si
19	No
21	No
24	Si
26	Si
27	No
28	Si
33	No
35	Si
38	Si
39	Si
40	No
43	Si
44	No
46	No
49	No
50	No
51	Si

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018

La cepa N° 11 fue antagónica, debido que existió la formación de halos de inhibición a las cajas Petri N° 15, 17, 18, 50, 46. La cepa N° 14 fue antagónica a las cajas Petri N° 21, 38,39. Cepa N° 14

fue antagonica a las cajas Petri N° 17, 24, 33,50. La cepa N° 18 fue antagonica a las cajas Petri N° 26,11. Cepa N° 24 fue antagonica a las cajas Petri N°15, 17, 19,21. Cepa N° 26 fue antagonica a las cajas Petri N° 17, 21,44. Cepa N° 28 fue antagonica a las cajas Petri N°11, 35,49 Cepa N° 35 fue antagonica a las cajas Petri N° 11, 15, 19, 46,40. Cepa N° 38 fue antagonica a las cajas Petri N° 19, 24, 28,33. Cepa N° 39 fue antagonica a las cajas Petri N° 11, 17, 27, 33,46. Cepa N° 43 fue antagonica a las cajas Petri N° 38,40. Cepa N° 51 fue antagonica a las cajas Petri N° 11, 26, 27, 28,49.Todas estas cepas presentaron formacion de halos de inhibicion.

Y las cepas N° 17,19,21,27,33,40,44,46,49,50 no son antagonicas debido a que no presentaron ningun halo como resultado estas 10 cepas bacterianas se seleccionaron para el consorcio bacteriano. La prueba de antagonismo bacteriano consiste en el enfrentamiento de diferentes cepas de bacterias con el fin de verificar cual de ellas es antagonica al resto de cepas, es decir el antagonismo bacteriano es la inhibicion, deterioro o muerte de un microorganismo por accion de otro. (Miranda, 2015)

4.1.5. Selección del consorcio Bacteriano

Tabla 8-4: Resultado de la selección del consorcio Bacteriano

Número de cepas	Emulsificante		Degradativa			Antagónica	
	Si	No	Si	No	Absorbancia	Si	No
1	-	X	-	X	-	-	-
2	-	X	-	X	-	-	-
3	-	X	-	X	-	-	-
4	-	X	-	X	-	-	-
5	-	X	-	X	-	-	-
6	-	X	-	X	-	-	-
7	-	X	-	X	-	-	-
8	-	X	-	X	-	-	-
9	-	X	-	X	-	-	-
10	-	X	-	X	-	-	-
11	X	-	X	-	0,561	X	-
12	-	X	-	X	-	-	-
13	-	X	-	X	-	-	-
14	X	-	X	-	1,378	X	-

15	X	-	X	-	3,174	X	-
16	-	X	-	X	-	-	-
17	X	-	X	-	1,493	-	X
18	X	-	X	-	0,628	X	-
19	X	-	X	-	0,795	-	X
20	-	X	-	X	-	-	-
21	X	-	X	-	1,968	-	X
22	-	X	-	X	-	-	-
23	-	X	-	X	-	-	-
24	X	-	X	-	2,06	X	-
25	-	X	-	X	-	-	-
26	X	-	X	-	2,698	X	-
27	X	-	X	-	1,974	-	X
28	X	-	X	-	2,627	X	-
29	-	X	-	X	-	-	-
30	-	X	-	X	-	-	-
31	-	X	-	X	-	-	-
32	-	X	-	X	-	-	-
33	X	-	X	-	0,192	-	X
34	-	X	-	X	-	-	-
35	X	-	X	-	0,894	X	-
36	-	X	-	X	-	-	-
37	-	X	-	X	-	-	-
38	X	-	X	-	0,853	X	-
39	X	-	X	-	0,983	X	-
40	X	-	X	-	0,76	-	X
41	-	X	-	X	-	-	-
42	-	X	-	X	-	-	-
43	X	-	X	-	0,351	X	-
44	X	-	X	-	0,205	-	X
45	-	X	-	X	-	-	-
46	X	-	X	-	0,348	-	X
47	-	X	-	X	-	-	-
48	-	X	-	X	-	-	-
49	X	-	X	-	0,457	-	X
50	X	-	X	-	0,484	-	X
51	X	-	X	-	1,934	X	-

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018

Se seleccionó de las 51 cepas bacterianas solo 10 como se puede observar en la tabla 8-4. Aquellas cepas bacterianas seleccionadas para conformar el consorcio bacteriano pasaron las pruebas de emulsificación, poder degradativo y la prueba de antagonismo.

4.1.6. Caracterización Microbiológica del Consorcio Bacteriano.

Tabla 9-4: Resultado de la Caracterización Microbiológica del Consorcio Bacteriano Obtenido.

Tinción Gram				
Número de Cepas	Gram Positivas	Gram Negativas	Forma celular	Esporulación
17	+		Bacilo	Si
19	+		Coco	Si
21		-	Coco	Si
27	+		Bacilo	Si
33		-	Bacilo	Si
40	+		Bacilo	Si
44	+		Bacilo	No
46	+		Bacilo	No
49	+		Bacilo	Si
50		-	Bacilo	Si

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018

Se obtuvo 10 cepas bacterianas para formar el consorcio bacteriano de las cuales 7 son Gram Positivas y 3 Gram Negativas, las cepas N.º 19 y 21 son de género Coco y el resto bacilo, y solo las cepas N.º 44 y 46 no presentan esporulación como se puede observar en la Tabla 9-4.

4.1.6.1. Prueba Catalasa

Tabla 10-4: Resultado de la Prueba Catalasa.

Catalasa		
Número de Cepas	Positiva	Negativa
17	+	
19		-
21		-
27	+	

33	+	
40	+	
44	+	
46	+	
49	+	
50	+	

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018

La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, el desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva. (Tesis de investigadores , 2011, p. 1)

Mediante la realización de esta prueba catalasa se determinó que las cepas N. °17, 27, 33, 40, 44, 46,49 y 50 poseen la enzima catalasa reaccionando positivamente y las cepas N.° 19 y 21 reaccionaron negativamente y no poseen esta enzima.

4.1.6.2. Caracterización Macroscópica del Consorcio Bacteriano.

Tabla 11-4: Resultado de Morfología y Pigmentación Microbiana.

Número de Cepas	Morfología				Pigmentación
	Forma	Superficie	Borde	Tamaño	Color
17	Fusiforme	Plana	Redondeado	Mediano	Blanco
19	Rizoide	Plana	Filamentoso	Mediano	Blanco
21	Circular	Plana	Redondeado	Pequeño	Morado
27	Irregular	Plana	Redondeado	Grande	Amarillo
33	Irregular	Plana	Redondeado	Mediano	Blanco
40	Irregular	Plana	Redondeado	Mediano	Blanco
44	Irregular	Plana	Ondulado	Mediano	Blanco
46	Irregular	Convexa	Redondeado	Grande	Blanco
49	Irregular	Plana	Redondeado	Grande	Blanco
50	Irregular	Plana	Redondeado	Mediano	Blanco

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018

En la caracterización macroscópica se observó que las cepas bacterianas presentaron 8 de color blanco, la cepa N.° 27 presentó un color amarillo y la cepa N. ° 21 presentó un color morado. En

cuanto a su forma era variada, las cepas N. ° 27, 33, 40, 44, 46, 49 y 50 eran irregulares, la cepa N.°17 presentaba una forma fusiforme, la cepa N.° 19 de forma rizoide y la cepa N.° 21 de forma circular.

La mayoría de ellas eran de superficie plana y una convexa. Referente a sus bordes en su mayoría eran redondeados, la cepa N.°19 presentó un borde filamentoso y la cepa N.°44 presentó un borde ondulado, todas estas cepas bacterianas poseían tamaño variado.

4.1.7. Resultado del valor de pH en el proceso de biorremediación

Tabla 12-4: Resultado del valor de pH.

Fecha	Tratamiento A			Tratamiento B			Tratamiento C		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Día 1	7,80	7,81	7,82	7,83	7,82	7,82	7,81	7,80	7,82
Día 8	7,65	7,66	7,66	7,67	7,68	7,67	7,68	7,69	7,69
Día 15	7,60	7,61	7,60	7,62	7,64	7,62	7,63	7,62	7,64
Día 22	7,55	7,56	7,56	7,59	7,60	7,62	7,76	7,79	7,74
Día 29	7,61	7,62	7,59	7,63	7,64	7,63	7,74	7,77	7,75
Día 36	7,70	7,71	7,69	7,70	7,72	7,69	7,74	7,76	7,73
Día 43	7,71	7,73	7,70	7,71	7,72	7,71	7,71	7,72	7,71
Día 52	7,77	7,75	7,76	7,74	7,76	7,76	7,74	7,75	7,73

Realizado por: Paola Rodríguez, 2018.

4.1.7.1. Carta parámetro de control- pH.

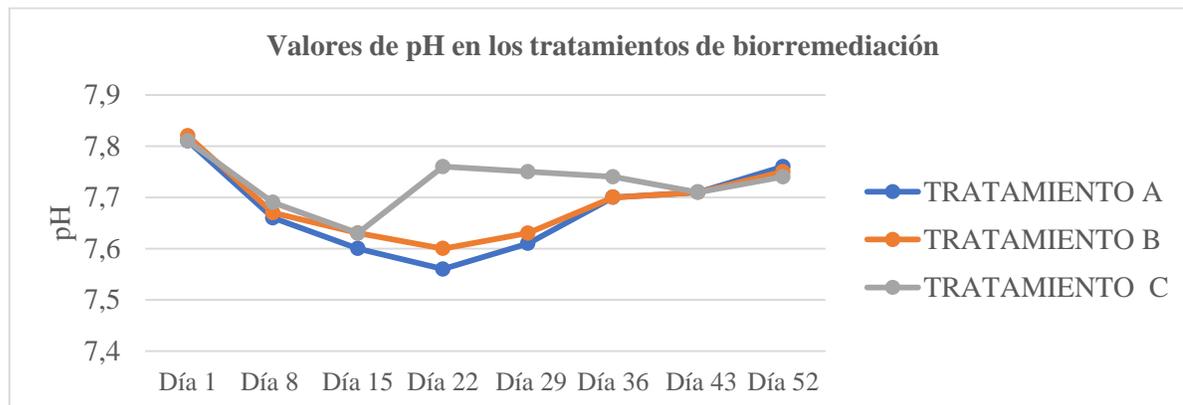


Gráfico 1-4: Valores de pH durante el proceso de biorremediación.

Realizado por: Paola Rodríguez, 2018

Se midió el pH del suelo contaminado con hidrocarburos durante el tratamiento de biorremediación, se mantiene oscilando entre los valores de 7,55 y 7,83 unidades de pH como se demuestra en la Tabla 12-4 y gráfico 1-4. Se observó un aumento de pH entre los días 29 y 52 en los tratamientos A y B. Mientras que el Tratamiento C los valores de pH se mantuvieron elevados en comparación de los tratamientos A y B.

4.1.8. Resultado de la Humedad en el proceso de biorremediación.

Tabla 13-4: Resultado de la Humedad, expresados en %.

Tiempo	Tratamiento A			Tratamiento B			Tratamiento C		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Día 1	78,80 %	78,80 %	78,00 %	78,80 %	78,80 %	78,80%	78,80%	78,80%	78,80 %
Día 8	72,50%	70,37%	71,49%	70,49%	69,48%	66,46%	73,22%	72,20 %	70,20%
Día 15	64,32%	62,30%	63,31%	61,26%	60,20%	59,28%	60,20%	62,33 %	60,24%
Día 22	54,27%	52,25%	50,28%	48,12%	46,10%	48,15%	53,10%	52,11%	50,13%
Día 29	69,94 %	68,70 %	69,70%	73,59%	70,50%	71,70 %	57,38%	56,60 %	56,47 %
Día 36	62,30 %	60,46 %	58,29 %	63,40 %	61,20 %	60,15 %	59,25 %	58,39%	58,79%
Día 43	62,84%	61,15%	59,20 %	63,90%	62,84%	61,29 %	61,19%	60,25 %	60,69 %
Día 52	59,64%	58,55%	57,20 %	53,90%	52,30%	52,90 %	56,20%	55,40%	56,70%

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018

4.1.7.1 Cartas de control parámetros-Humedad

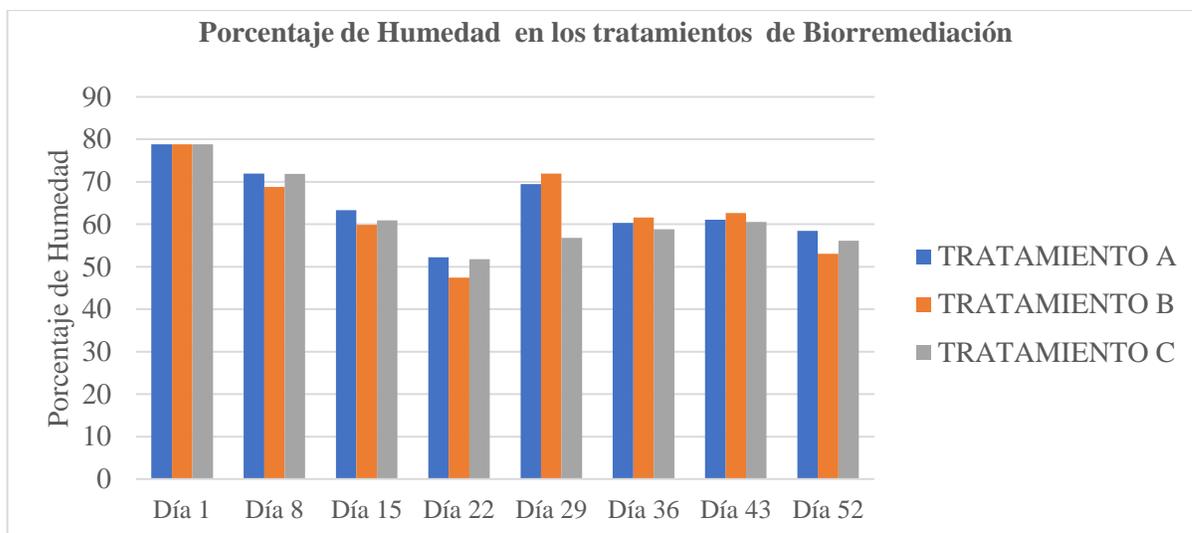


Gráfico 2-4: Variación de la Humedad durante el proceso de biorremediación.

Realizado por: Rodríguez, Paola.2018.

Se registró el control de la humedad en el periodo de 52 días que duró del proceso de biorremediación. Los valores de la humedad en los tratamientos A, B fluctuaron entre 78.80 % y 46.10 %, la humedad del tratamiento C presentó valores entre 78.8 % y 50.13% estos valores se mantienen variables como se puede observar en la tabla 13-4 y Gráfico 2-4.

A partir del día 29 la humedad de los tratamientos A y B aumentó debido que se añadió la cantidad de inóculo faltante para que se completara los 3000 mL. Los valores de porcentaje de humedad no afectaron durante el proceso de biorremediación que están dentro de los rangos establecidos para la biorremediación y los cambios de humedad fueron paulatinos.

4.1.8.1. Resultado del Conteo Bacteriano en los tratamientos: A, B y C con sus correspondientes repeticiones.

Tabla 14-4: Resultado del Conteo Bacteriano expresadas en UFC/g.

Tiempo	Tratamiento A			Tratamiento B			Tratamiento C		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Día 1	8,00 E+05	8,00 E+05	8,00 E+05	8,00 E+05	8,00 E+05	8,00 E+05	8,00 E+05	8,00 E+05	8,00 E+05

Día 8	6,00 E+06	8,00 E+06	7,00 E+06	8,00 E+09	7,00 E+09	6,00 E+09	9,00 E+05	8,00 E+05	7,00E+0 5
Día 15	6,00 E+07	5,00 E+07	8,00 E+07	960,00 E+10	961,00 E+10	950,00 E+10	6,00 E+6	7,00 E+6	4,00E+ 6
Día 22	4,00 E+06	3,00 E+06	5,00 E+06	107,00 E+08	100,00 E+08	105,00 E+08	6,00 E+05	5,00 E+05	6,00 E+05
Día 29	44,00 E+10	40,00 E+10	38,00 E+10	10,00 E+10	8,00 E+10	9,00 E+10	14,00 E+10	12,00 E+10	9,00 E+10
Día 36	50,00 E+10	52,00 E+10	49,00 E+10	62,00 E+10	60,00 E+10	59,00 E+10	26,00 E+10	20,00 E+10	22,00 E+10
Día 43	46,00 E+08	48,00 E+08	45,00 E+08	55,00 E+08	52,00 E+08	51,00 E+08	20,00 E+08	15,00 E+08	18,00 E+08
Día 52	4,00 E+07	5,00 E+07	4,00 E+07	5,00 E+07	6,00 E+07	5,00 E+07	3,00 E+07	2,00 E+07	2,00 E+07

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018

4.1.8.2. Cartas de control parámetros-Conteo bacteriano.

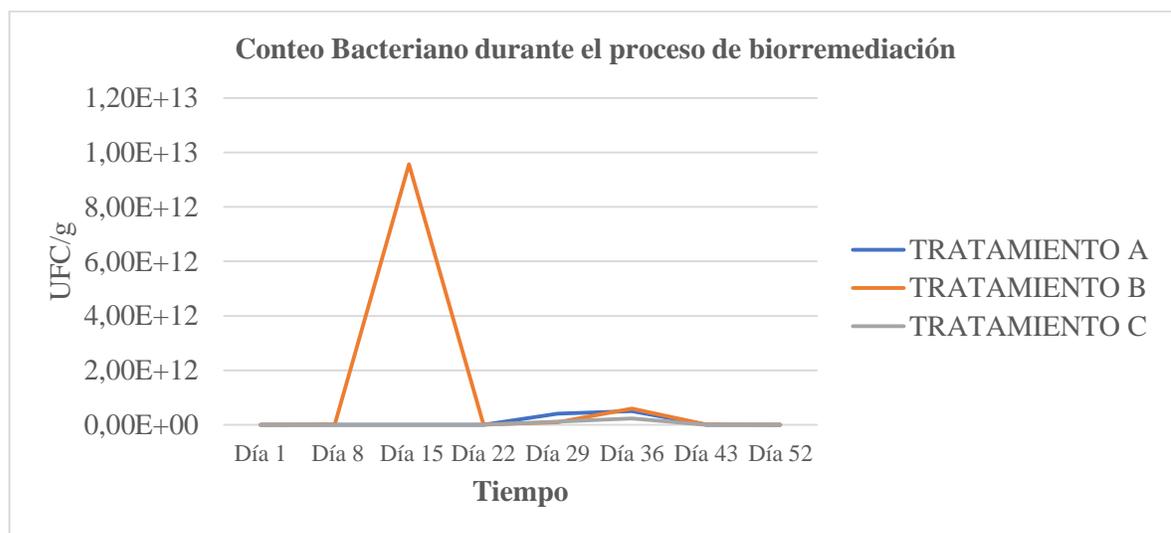


Gráfico 3-4: Variación del Conteo Bacteriano durante el proceso de biorremediación.

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018

Se realizó un total de 8 mediciones de crecimiento bacteriano en los tratamientos: A, B, C cada uno con sus tres repeticiones experimentales durante el proceso de biorremediación. Una vez que se realizó la inoculación en el TA y TB, se observó un alto crecimiento exponencial con un valor de 9,61 E+12 UFC/g correspondientes al TB en sus 3 repeticiones en el día 15 pero en el día 22 en

estos dos tratamientos se observó una decadencia, motivo por el cual se adicionó la cantidad de inóculo faltante para que se completara los 3000 mL; se adicionó en el día 29.

El Tratamiento C desde el día 1 hasta el día 36 no ha tenido decadencia de microorganismos, pero si se observó una disminución bacteriana a partir del día 43 hasta el día 52 en estos tres tratamientos.

4.1.9. Resultado del parámetro de Temperatura.

Tabla 15-4: Resultado de la Temperatura, expresada en °C.

Tiempo	Temperatura
Día 1	18 °C
Día 29	17 °C
Día 52	16 °C

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018

El rango de temperatura durante el proceso de biorremediación osciló entre 16 °C y 18 °C.

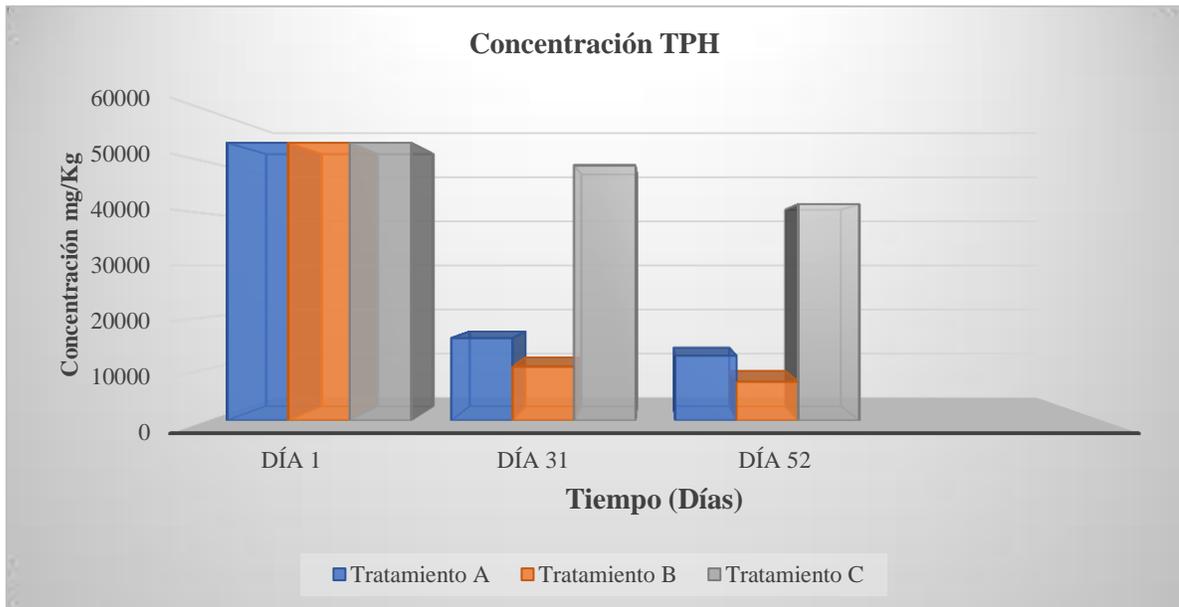
4.1.10. Concentración de TPH en el proceso de Biorremediación.

Tabla 16-4: Variación de la concentración de TPH en el proceso de biorremediación en Unidades de mg/kg

Tiempo	Tratamiento A	Tratamiento B	Tratamiento C
Día 1	53696,27 mg/Kg	53696,27 mg/Kg	53696,27 mg/Kg
Día 31	15959,32 mg/Kg	10460,40 mg/Kg	49347,35mg/Kg
Día 52	12517, 39mg/Kg	7517,76 mg/Kg	41834,19mg/Kg

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018

4.1.10.1. Cartas de control parámetros -Hidrocarburos Totales de Petróleo.



Gráfico 4-4: Concentración de TPH durante el proceso de biorremediación

Realizado por: Paola Rodríguez, 2018

En condiciones controladas de pH, humedad y conteo microbiano el periodo de biorremediación utilizando un consorcio bacteriano en los tres diferentes tratamientos A, B, C tuvo una duración de 52 días desde la inoculación del consorcio bacteriano en el suelo contaminado.

Transcurrido el proceso de biorremediación se realizó las lecturas de la concentración de TPH al suelo contaminado con hidrocarburos, en el día 1 se ingres  el suelo contaminado con un valor de 53696,27 mg/Kg de TPH, se midió los valores de TPH de los tratamientos A, B y C durante 31 y 52 días que duró el proceso de biorremediación, tal como se observa en la tabla 16-4 y gráfico 4-4. Los tratamientos A y B mostraron un resultado óptimo en la baja concentración de TPH, mientras que al Tratamiento C se observó una mínima remoción de TPH. Como resultado se identificó que el tratamiento que posee una mayor reducción de TPH es el TB al cual se le aplicó el inóculo más materia orgánica, la concentración de TPH se redujo desde 53696,27 mg/kg a 7517,76 mg/Kg, dando un porcentaje de disminución 86,00% de TPH.

4.1.11. Resultados de la Caracterización de Ni, Pb, Cd y N del suelo biorremediado.

Tabla 17-4: Caracterización de Ni, Pb, Cd y N.

Parámetro	Tratamientos	Resultado en porcentaje
Metales Pesados	TA	
Cd		0,23%
Ni		1,74%
Pb		5,73%
Nutriente		
N		1,46%
Metales Pesados	TB	
Cd		0,28%
Ni		2,69%
Pb		3,59%
Nutriente		
N		1,13%
Metales Pesados	TC	
Cd		0,66%
Ni		5,37%
Pb		6,82%
Nutriente		
N		1,76%

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018

Con los resultados obtenidos de la caracterización final del suelo biorremediado especialmente en los metales pesados de Cd, Ni y Pb se identificó que estos valores han disminuido en el proceso de biorremediación con una moderada cantidad. Estos valores se encuentran dentro de los límites permisibles acuerdo con la Tabla 6 del RAOHE-1215, y también bajo la normativa de la Tabla 3. Anexo 2, Libro VI del TULSMA.

Por último, se caracterizó el Nitrógeno, existiendo una buena cantidad de nutriente que es esencial para el proceso de biorremediación

4.1.12. Resultado del proceso de biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos.

Tabla 18-4: Resultado del proceso de biorremediación del suelo contaminado con TPH.

Parámetro	Tratamientos	Porcentaje de Degradación
TPH	TA	76,90 %
	TB	86,00%
	TC	22,10 %

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018

De acuerdo con la realización de lecturas de concentración de TPH a los 31 y 52 días que duró el proceso de remediación para cada uno de los tratamientos aplicados, el tratamiento que posee una mayor reducción de TPH es el Tratamiento B al cual se le aplicó el inóculo más materia orgánica, su concentración de TPH se redujo desde 53696,27 mg/kg hasta 7517,76 mg/Kg, dando como resultado una disminución de 86,00% de TPH.

En el tratamiento A al cual se le aplicó solamente el inóculo, su concentración de TPH se redujo desde 53696,27 mg/kg hasta 12517,39 mg/Kg, dando como resultado una disminución de 76,90% de TPH. Y al tratamiento C al cual no se le aplicó inóculo ni materia orgánica, su concentración de TPH se redujo desde 53696,27 mg/kg hasta 41834,19 mg/Kg, dando como resultado una disminución de 22,10 % de TPH.

4.2. Pruebas de Hipótesis

Hipótesis general: El consorcio bacteriano conformado disminuirá la concentración de los contaminantes identificados en las muestras de suelos provenientes de la Estación Secoya por lo menos un 70%.

Valor de pH

Hipótesis de igual factor a:

$$H_0: \mu_{A1} = \mu_{A2}$$

$$H_0: \mu_{A2} = \mu_{A3}$$

$$H_0: \mu_{A1} = \mu_{A3}$$

Hipótesis alterna factor a:

$$H_1: \mu_{A1} \neq \mu_{A2}$$

$$H_1: \mu_{A2} \neq \mu_{A3}$$

$$H1: \mu A1 \neq \mu A3$$

Regla de decisión

$F_{tab} > F_{cal}$ Acepto H_0

$F_{cal} > F_{tab}$ Acepto H_1

Tabla 19-4: Resumen

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
R1a	8	61,47	7,68375	0,011198214
R1b	8	61,45	7,68125	0,006926786
R1c	8	61,38	7,6725	0,007907143
R2a	8	61,49	7,68625	0,0059125
R2b	8	61,58	7,6975	0,005192857
R2c	8	61,52	7,69	0,005142857
R3a	8	61,81	7,72625	0,0029125
R3b	8	61,9	7,7375	0,003535714
R3c	8	61,81	7,72625	0,002655357

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018.

Tabla 20-4: Análisis de varianza Anova para Valor de pH.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,035611111	8	0,004451389	0,7796698	0,62204674	2,08919
Dentro de los grupos	0,3596875	63	0,005709325	52	7	
Total	0,395298611	71				

Realizado por: Paola Rodríguez ,2018

Decisión

Los valores obtenidos es 0,395298611, siendo la varianza del tratamiento de 0,035611111, el margen de error es de 0,35966875; y los grados de libertades de 71, se procede al cálculo del fcal (f. calculada) cuyo valor es de 2,08919 es mayor que el Ftab (f tabulado) que corresponde

0,779669852, donde se identifica que se acepta la hipótesis nula identificando que los Valor de pH son todos diferentes.

Debido a que los tratamientos son diferentes se realizó la comparacion de los tratamientos con la finalidad de identificar cual tratamiento es el más adecuado (A,B,C), para ello se aplicó el método tukey, donde se aplicó la siguientes variante para determinar la diferencia significativa:

Diferencias significativas 0,04
 Multiplicados de q alfa 4,47
 Cuadro del error medio 0,006
 N 8

Tabla 21- 4: Cálculo de diferencia metodo tukey valor pH.

		TA			TB			TC		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
TA	R1		0,00	0,01	0,00	-0,01	-0,01	-0,04	-0,05	-0,04
	R2			0,01	-0,01	-0,02	-0,01	-0,04	-0,06	-0,04
	R3				-0,01	-0,03	-0,02	-0,05	-0,07	-0,05
TB	R1					-0,01	0,00	-0,04	-0,05	-0,04
	R2						0,01	-0,03	-0,04	-0,03
	R3							-0,04	-0,05	-0,04
TC	R1								-0,01	0,00
	R2									0,01
	R3									

Realizado por: Paola Rodríguez, 2018

En esta tabla a través del método tukey se evidencia que si existe diferencias entre los grupos de tratado, donde el TRATAMIENTO C: existen diferencias entre R1 con tratamiento A R3; tratamiento C R2 con tratamiento A R1, R2 y R3; y tratamiento B R y R, y tratamiento C R3 con el tratamiento A R3, donde se denota que existe una diferencia significativa en el tratamiento de valor pH. El resultado óptimo es menor a 70% se encuentran los datos menores a 0,04 de la tabla 21-4, con el 26,65% para los valores de 0,01.

Humedad, expresados en %

Hipótesis de igual factor a

Ho: $\mu A1 = \mu A2$

Ho: $\mu A2 = \mu A3$

Ho: $\mu A1 = \mu A3$

Hipótesis alterna factor a

H1: $\mu A1 \neq \mu A2$

H1: $\mu A2 \neq \mu A3$

H1: $\mu A1 \neq \mu A3$

Regla de decisión

$F_{tab} > F_{cal}$ Acepto Ho

$F_{cal} > F_{tab}$ Acepto H1

Tabla 22-4: Resumen análisis Anova Humedad.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
TA R1	8	5,2461	0,6557625	0,00606739
TA R2	8	5,1258	0,640725	0,00675677
TA R3	8	5,0747	0,6343375	0,00818034
TB R1	8	5,1446	0,643075	0,0101422
TB R2	8	5,0142	0,626775	0,0108322
TB R3	8	4,9873	0,6234125	0,00973211
TC R1	8	4,9934	0,624175	0,00789124
TC R2	8	4,9608	0,6201	0,00818593
TC R3	8	4,9202	0,615025	0,00803122

Realizado por: Paola Rodríguez, 2018

Tabla 23-4: Análisis de varianza Anova para Humedad.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,0108686	9	0,00120762	0,1410 7314	0,9982400 2	2,03477379
Dentro de los grupos	0,53073576	62	0,00856025			
Total	0,54160436	71				

Realizado por: Paola Rodríguez, 2018

Decisión

Los valores obtenidos es 0,541604261, siendo la varianza del tratamiento de 0,0108686, el margen de error es de 0,53073576; y los grados de libertad es de 71, se procede al cálculo de f_{cal} (f calculada) es de 2,03477379 mayor que el F_{tab} (f tabulado) que corresponde a 0,14107314, donde se identifica que se acepta la hipótesis nula identificando que el valor de humedad es diferente de un tratamiento a otro.

Debido a que los tratamientos son diferentes se realizó la comparación de los tratamientos con la finalidad de identificar cual tratamiento es el más adecuado (A,B,C), para ello se aplicó el método tukey, donde se aplicó la siguientes variantes para determinar la diferencia significativa:

Diferencias significativas	0,005
Multiplicados de q alfa	4,17
Cuadro del error medio	0,009
N	8

Tabla 24-4: Cálculo de diferencia metodo Tukey Humedad.

		TA			TB			TC		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
TA	R1		0,02	0,02	0,01	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04
	R2			0,01	0,00	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03
	R3				-0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
TB	R1					0,02	0,02	0,02	0,02	0,03
	R2						0,00	0,00	0,01	0,01
	R3							0,00	0,00	0,01
TC	R1								0,00	0,01
	R2									0,01
	R3									

Realizado por: Paola Rodríguez, 2018

En esta tabla a través del método tukey se evidencia que si existe diferencias entre los grupos de tratado, TRATAMIENTO A existe diferencia en R2, R3; TRATAMIENTO B existe diferencia en R2 y R3 con relación a los resultados R1, R2, así también con los resultados de Tratamiento B R1 y R3; TRATAMIENTO C existe diferencias en R1, R2 Y R3 con relación al tratamiento A R1, R2 y R3 y Tratamiento B R1. El resultado óptimo es menor a 70% se encuentran los datos menores a 0,05 de la tabla 24-4, con el 23,29% para los valores de 0,01.

Variación de la concentración de TPH en el proceso de biorremediación Hipótesis de igual factor a:

$$H_0: \mu A1 = \mu A2$$

$$H_0: \mu A2 = \mu A3$$

$$H_0: \mu A1 = \mu A3$$

Hipótesis alterna factor a:

$$H_1: \mu A1 \neq \mu A2$$

$$H_1: \mu A2 \neq \mu A3$$

$$H_1: \mu A1 \neq \mu A3$$

Regla de decisión

$$F_{tab} > F_{cal} \text{ Acepto } H_0$$

$$F_{cal} > F_{tab} \text{ Acepto } H_1$$

Tabla 25-4: Resumen Análisis de varianza Anova Variación concentración de TPH

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
TA	3	82172,98	27390,9933	521937406
TB	3	71674,43	23891,4767	668409062
TC	3	144877,81	48292,6033	36011603,4

Realizado por: Paola Rodríguez, 2018

Tabla 26-4: Análisis de varianza Anova Variación de la concentración de TPH

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1044538900	2	522269450	1,27761083	0,34495302	5,14325285
Dentro de los grupos	2452716142	6	408786024			
Total	3497255042	8				

Realizado por: Paola Rodríguez, 2018

Decisión

Los valores obtenidos es 3497255042, siendo la varianza del tratamiento de 1044538900, el margen de error es de 2452716142; y los grados de libertad es de 8, se procede al cálculo de f_{cal} (f calculada) es de 5,14325285 mayor que el F_{tab} (f tabulado) que corresponde a 1,27761083, donde se identifica que se acepta la hipótesis nula identificando que el Variación de la concentración de TPH en el proceso de biorremediación son diferentes de un tratamiento a otro.

Debido a que los tratamientos son diferentes se realizó la comparación de los tratamientos con la finalidad de identificar cual tratamiento es el más adecuado (A,B,C), para ello se aplicó el método tukey donde se aplicó las siguientes variantes para determinar la diferencia significativa:

Diferencias significativas	27227,52
Multiplicados de q alfa	4,04
Cuadro del error medio	408786024
N	3

Tabla 27-4: Cálculo de diferencia método tukey Variación de la concentración de TPH en el proceso d biorremediación.

	TA	TB	TC
TA		3499,52	-20901,61
TB			-24401,13
TC			

Realizado por: Paola Rodríguez, 2018

En esta tabla a través del método tukey se evidencia que si existe diferencias entre los grupos de tratado, TRATAMIENTO B con relación al tratamiento A Siendo que el valor general de referencia deben ser menor para que existe un porcentaje de disminución. Siendo el TB el que mayor incida con el 12,85% y de 76, 77% Tratamiento C en relación al tratamiento A. Pero en comparación del tratamiento B el tratamiento C es del 89, 62%. *Con este análisis se acepta la hipótesis planteada en la investigación.*

Caracterización de Ni, Pb, Cd y N

Hipótesis de igual factor a:

$$H_0: \mu_{A1} = \mu_{A2}$$

$$H_0: \mu_{A2} = \mu_{A3}$$

$$H_0: \mu_{A1} = \mu_{A3}$$

Hipótesis alterna factor a:

$$H_1: \mu_{A1} \neq \mu_{A2}$$

$$H_1: \mu_{A2} \neq \mu_{A3}$$

$$H_1: \mu_{A1} \neq \mu_{A3}$$

Regla de decisión

$$F_{tab} > F_{cal} \text{ Acepto } H_0$$

$$F_{cal} > F_{tab} \text{ Acepto } H_1$$

Tabla 28-4: Resumen Análisis de varianza Anova Variación de la concentración Caracterización de Ni, Pb, Cd y N.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
TA	4	1,537	0,38425	0,51486636
TB	4	1,1956	0,2989	0,30718514
TC	4	1,8885	0,472125	0,73785681

Realizado por: Paola Rodríguez, 2018

Tabla 29-4: Análisis de varianza Anova Variación de la concentración Caracterización de Ni, Pb, Cd y N

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,06001805	2	0,03000903	0,05771306	0,9442672	4,25649473
Dentro de los grupos	4,67972494	9	0,51996944			
Total	4,73974299	11				

Realizado por: Paola Rodríguez, 2018

Decisión

Los valores obtenidos es 4,73974299 siendo la varianza del tratamiento de 0,06001805, el margen de error es de 4,67972493; y los grados de libertad es de 11, se procede al cálculo de f_{cal} ($f_{calculada}$) es de 4,25649473 mayor que el F_{tab} ($f_{tabulado}$) que corresponde a 0,057771306, donde se identifica que se acepta la hipótesis nula identificando que el Variación de la concentración Caracterización de Ni, Pb, Cd y N son diferentes de un tratamiento a otro.

Debido a que los tratamientos son diferentes se realizó la comparación de los tratamientos con la finalidad de identificar cual tratamiento es el más adecuado (A,B,C), para ello se aplicó el método tukey, donde se aplicó las siguientes variantes para determinar la diferencia significativa:

Diferencias significativas	0,279
Multiplicados de q alfa	4,26
Cuadro del error medio	0,51996944
N	11

Tabla 30-4: Cálculo de diferencia metodo tukey variación de la Caracterización de Ni, Pb, Cd y N

	TA	TB	TC
TA		0,09	-0,09
TB			-0,17
TC			

Realizado por: Paola Rodríguez, 2018

En este caso el nivel de variación y es de 0,279, por ende, comparando con los datos obtenidos se considera que existe variación significativa entre los tratamientos TB, TC en relación con el tratamiento A. Siendo que el valor general de referencia deben ser menor para que existe un porcentaje de dismunucion. Siendo el TB el que mayor incida con el 12,85% y en el tratamiento C la variación es del 62,03%.

4.3. Discusión de Resultados

En la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos se utilizó la técnica de bioaugmentación, mediante la realización de diluciones sucesivas, conteo bacteriano, aislamiento - purificación, siembra en placa y pruebas selectivas se obtuvo el consorcio bacteriano aerobio nativo capaz de degradar los hidrocarburos totales de petróleo.

Con los 9 kg de suelo contaminado se distribuyó 1 kg para cada uno de los tratamientos: A, B, C, y sus 3 repeticiones. En el tratamiento A contenía 500 mL de inóculo, obteniéndose una degradación de TPH al 76,90 % siendo un tratamiento eficaz aunque no contenía materia orgánica, para el Tratamiento B (500 mL de inóculo más 150 g de aserrín y 150 g de cáscaras de limón) se obtuvo una degradación de TPH al 86,00%, mostrando que el consorcio bacteriano en presencia de materia orgánica produjo una mayor degradación de TPH debido que los ácidos cítricos presentes otorgan mayor poder emulsificante y más fuente de nutrientes para acelerar el proceso de biorremediación y para el Tratamiento C (no se adicionó inóculo ni materia orgánica) se obtuvo una degradación de TPH al 22,10%, debido a los microorganismos presentes en la muestra, y el aporte de oxígeno y humedad y es un proceso lento, efectuándose en este tratamiento niveles bajos de eficiencia de los TPH.

Estos tratamientos se controlaron cada 7 días los parámetros de aireación, humedad, pH y conteo microbiano para el óptimo desarrollo de los microorganismos. Y a pesar de que el pH del suelo era ligeramente alcalino con un valor inicial de 7,80 unidades de pH, este valor se encontró casi al límite de los rangos permitidos para los valores de pH en un proceso de biorremediación, se vio la necesidad de utilizar urea que es un material estabilizante del suelo contaminado. (Muñoz & Pacheco, 2017, pp. 18-20). Se adicionó en los tres tratamientos una vez por semana hasta el día 15 y se observó una disminución de 7,64 unidades de pH. Otro motivo para disminuir el pH se debe que, durante un proceso de biorremediación en la fase inicial, la mayoría del nitrógeno metabolizado es usado para el crecimiento de los microorganismos, pero durante la fase de mayor actividad se libera el ión amonio. El sistema amonio incrementa el pH máximo a valores 9,24 (Instituto Politécnico Nacional , 2107, p. 36).

Se consideró que el suelo biorremediado aún no es apto para uso agrícola o industrial comparando estos resultados con la tabla 6 (RAOHE-1215). Con respecto a los porcentajes de degradación del Tratamiento A y B cumplieron y sobresalieron con la hipótesis planteada de disminuir el 70 % de contaminantes TPH y de esta manera se hizo la relación si en el Tratamiento B en 52 días se logró

la degradación con un valor de 7517,76 mg/kg de TPH en 18 días aproximadamente se logrará completar el proceso de biorremediación, en relación con la tabla 6 RAOHE-1215 para suelos de uso agrícola, dando la apertura de seguir con el proceso de biorremediación en el laboratorio Cestta.

Con la caracterización microbiológica de las bacterias del consorcio bacteriano se estableció que 8 de ellos son de tipo *Bacilo* y 2 de Tipo *Coco*, 7 son Gram + y 3 Gram -, además se concluyó de acuerdo con la hipótesis que existió gran presencia de microorganismos nativos degradadores de TPH.

De acuerdo con las características microbiológicas de este consorcio bacteriano y sus similitudes pueden pertenecer al género *Streptomyces* ya que ha sido aplicado en distintas investigaciones, entre las más importantes (Cando, 2011, p. 91). En donde se aplicó el microorganismo *Streptomyces spp* utilizados para la degradación de TPH. Y reveló que los microorganismos *Streptomyces* en suelos contaminados con hidrocarburos, tienen la capacidad de utilizar al petróleo como única fuente de carbono desarrollando mejores resultados en la degradación de TPH. (Cando, 2011 pág. 91). Los *Streptomyces* de acuerdo con varias investigaciones son bacterias más eficientes en la degradación de hidrocarburos y dependerá del tiempo de contacto con el contaminante y las condiciones ambientales en las que se desarrollen (Arboleda & Bravo, 2008, p. 34). Las bacterias *Streptomyces* son bacilos Gram positivos, aerobios de catalasa positiva (Cando, 2011, p. 91).

Este proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos se realizó en un periodo de 7 meses incluido los 52 días a partir que se inoculó el consorcio bacteriano para la degradación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH).

Al comparar el presente estudio con otras investigaciones se puede recalcar:

(Cando, 2011, p. 135) Con la finalidad de biorremediar hidrocarburos se empleó bacterias nativas presentes en una matriz contaminada de lodo con crudo residual y suelo contaminado con hidrocarburos T1 (terreno mineral y el microorganismo *Streptomyces spp*), T2 (caldo de cultivo Tripticasa de Soya y el microorganismo *Streptomyces spp*) y en el T3 (consorcio microbiano formado por la bacteria *Streptomyces* y un *bacilo* gram positivo *B₈*) en caldo Tripticasa de Soya. De acuerdo con los resultados se obtuvo porcentajes de degradación de TPH en los tratamientos: T1 con 20.9%, T2 % con 22.5 % y T3 29.7 %. Y para los compuestos HAPs hubo un resultado con la degradación de Naftaleno al 99.02 %. Con una duración de 30 días para el proceso de biorremediación. Lo cual indica que es importante la aplicación de un consorcio bacteriano, y no sólo una especie bacteriana, ya que en nuestro caso se obtuvo mejores resultados.

Según (Acosta, 2012, p. 62) para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos mediante la técnica de bioaumentación y con el uso de un consorcio bacteriano se diseñó un área de biorremediación de 115 m x 75 m donde se dispusieron 473 m³ de residual mezclando con tierra fértil, se aplicó 76 640 L de consorcio bacteriano producidos en un biorreactor de 12 000 L. Como resultado se obtuvo la remoción del 90 % TPH durante 120 días de tratamiento con el consorcio bacteriano. Siendo esta técnica de bioaumentación factible en el proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos y según (Cando, 2011, p. 136) favorece la velocidad de degradación por el uso de poblaciones grandes de bacterias.

Otra investigación importante (Miranda, 2015, pp. 55-57) se enfocó en el aislamiento, identificación y elaboración de consorcios bacterianos para biorremediación de aguas y sedimentos contaminados provenientes del residual de las muestras ingresadas al laboratorio CESTTA. Se realizó la caracterización fisicoquímica y microbiológica de los suelos y aguas mediante el aislamiento, purificación y la técnica de siembras sucesivas de cepas, se incluyó la reducción de metales. Al finalizar las pruebas de selección se obtuvo 9 cepas bacterianas que se agruparon en tres consorcios: el consorcio A estaba formado por cuatro cepas, el consorcio B por cinco cepas y al consorcio C formado por todas las cepas anteriores. Como resultado se obtuvo que el consorcio C fue el más efectivo por presentar porcentajes más altos de reducción de contaminantes; TPH 96,14 %, Cd 64,90 %, Ni 48,92 %, Pb 37,86 %. La concentración de TPH se reduce de 5428,41 ppm a 209,45 ppm. Por lo tanto, los tratamientos dependen de los microorganismos, de la concentración inicial, y de las características del suelo contaminado.

Conforme con los resultados de esta investigación y las investigaciones mencionadas se verificó que tienen una relativa diferencia acorde a la degradación de las concentraciones de TPH por tratamiento, considerando que en todos los casos los TPH fueron reducidos al emplear consorcios bacterianos en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Y a pesar de que este suelo aún no esté dentro de las normativas ambientales: tabla 6 del Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarbúferas en Ecuador (RAOHE-1215) y Tabla 3. Libro VI. Del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio de Ambiente. Una de las razones principales es la gran cantidad inicial de TPH 53696,27 mg/kg se redujo a 7517.76 mg/kg, dando un porcentaje de remoción de TPH al 86% considerándose un proceso de biorremediación favorable incluso con grandes concentraciones de TPH.

CONCLUSIONES

- ✓ Se realizó la biorremediación de los suelos contaminados de la Estación Secoya a escala de laboratorio mediante la aplicación de un consorcio bacteriano aerobio logrando degradar los Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH) con el tratamiento B siendo el más efectivo.
- ✓ Los resultados de la caracterización fisicoquímica del suelo mostraron una contaminación por TPH con una concentración inicial de 53696,27 mg/kg superando los límites permisibles establecidos en la tabla 6 del RAOHE (1215). Y la concentración de metales pesados: Cd, Ni, Pb fueron valores inferiores a los límites permisibles de acuerdo con la Tabla 3. Libro VI del TULSMA. Con la caracterización microbiológica se determinó la existencia de microorganismos nativos con una máxima concentración de 961,00 E+10 UFC/g presentes en el Tratamiento B. Además, el consorcio bacteriano está formado por 8 cepas de tipo *Bacilo* y 2 de tipo *Coco*, 7 de ellas son Gram + y 3 Gram –.
- ✓ Mediante las pruebas de emulsificación, degradación, antagonismo e incluidas técnicas de diluciones sucesivas, conteo bacteriano, aislamiento, siembra en placa se seleccionó 10 cepas potenciales eficaces para el desarrollo y producción del consorcio bacteriano en el proceso de biorremediación.
- ✓ Se efectuó la inoculación del consorcio bacteriano aerobio al área del suelo contaminado, con el tratamiento B se obtuvo una degradación desde 53696,27 mg/kg hasta 7517,76 mg/kg de TPH, no se presentó contaminación de los metales pesados: Cd, Ni, Pb. Considerándose un suelo biorremediado, pero no para uso agrícola o industrial de acuerdo con la tabla 3. Anexo 2 del Libro VI del TUSLMA y la tabla 6 del RAOHE (1215).
- ✓ Se utilizó la técnica de bioaumentación para la elaboración del consorcio bacteriano y al suelo contaminado se estableció con tres tratamientos: TA (500 mL con inóculo), TB (500 mL con inóculo más 30 % materia orgánica,) y TC (degradación natural). Para el tratamiento A se obtuvo el 76,90 %, Tratamiento B 86 % Tratamiento C 22,10 % de remoción de TPH. En el tratamiento B se obtuvo los mejores resultados.

RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda la biorremediación mediante la técnica de bioaumentación por ser un método eficiente para la degradación de TPH en suelos contaminados con hidrocarburo.
- ✓ Se recomienda realizar la identificación Microbiológica de las cepas bacterianas encontradas.
- ✓ Se recomienda hacer mayores estudios orientados a la reducción de metales pesados y otros contaminantes mediante la obtención de consorcios bacterianos nativos.
- ✓ Se recomienda seguir con el proceso de biorremediación hasta que posean valores inferiores de acuerdo con la tabla 6 del RAOHE- 1215.
- ✓ Utilizar el equipo de protección adecuado al realizar las técnicas y pruebas de las cepas bacterianas.

GLOSARIO

HNO₃	Ácido Nítrico
TPH	Hidrocarburos Totales de Petróleo
HAPs	Hidrocarburos Aromáticos Totales
mg/Kg	Miligramo por Kilogramo
mg/L	Miligramo por Litro
mL	Mililitros
Ni	Níquel
P	Fósforo
N	Nitrógeno
Pb	Plomo
pH	Potencial de Hidrógeno
Ufc/g	Unidades Formadoras de Colonias por gramo
UAE/mL	Unidades de Actividad Emulsificante por mililitro
TA	Tratamiento A
TB	Tratamiento B
TC	Tratamiento C

BIBLIOGRAFÍA

Acosta, Jelvys. *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a partir del uso de un consorcio bacteriano alóctono, en la zona costera de punta Majagua. Cienfuegos, Cuba.*, [en línea]. Santa Clara-Cuba : Universidd Central "Marta Abreu" de las Villas. 2012,p.62 [Consulta 20 julio 2018]. Disponible en:

<http://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/3176/Jelvys%20Berm%C3%BAdez%20Aco%20sta.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Almeida, Alexandra y Suárez, Wilson. *Toxitour: Recorrido por el campo libertador en la provincia de Sucumbios en Ecuador.* [En línea] *Oilwatch. Latino América.* 2005, p.1. [Consulta 20 julio 2018]. Disponible en:

<http://www.oilwatchesudamerica.org/petroleo-en-sudamerica/ecuador/632-toxitour-recorrido-por-el-campo-libertador-en-la-provincia-de-sucumbios-en-ecuador.html>.

Arboleda, Viviana Gabriela y Bravo, Verónica Mercedes. *Biorremediación del suelo contaminado con Hidrocarburos de la Central Hidroeléctrica del Campamento Secoya mediante Landfarmig.* [En línea] *Riobamba-Ecuador.* 2008, pp. 33-34. [Consulta 20 julio 2018]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/222>

Cando, Miguel Ángel. *Determinación y Análisis de un proceso de Biorremediación de suelos contaminados por Hidrocarburos.* [En línea]. Cuenca: Universidad Politécnica Salesiana Sede-Cuenca. 2011. pp. 46-47. [Consulta 30 mayo 2018]

Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1520/11/UPS-CT002143.pdf>

Cazorla, Evelyn Mishel. *Obtención del consorcio Bacteriano nativo del Sedimento de la Laguna San Antonio del Cantón Riobamba.* [En línea]. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2014. p.29 [Consulta: 29 julio 2018]. Disponible en:

<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3498/1/236T0102%20UDCTFC.pdf>

Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental, CESTTA. *Parametros Laboratorio de Análisis Ambiental e Inspección LABCESTTA.* [En línea] Cestta 2018. [Consulta: 29 julio 2018]. Disponible en: <http://www.cestta.com.ec/>

Decreto Ejecutivo 1215, Registro Oficial 265. *Tablas y sus límites permisibles establecidas en el RAOHE 1215: tabla 6 . Reglamento Ambiental de Operaciones Hidrocarburíferas RAOHE- 1215.* [En línea] 13 de Febrero de 2001. [Consulta: 29 julio 2018]. Disponible en: <http://aqlabec.com/ANALISIS%20A%20REALIZAR.pdf>.

Espinosa, José. *Ácidez y encalado de los suelos.* [En línea] IPNI International Plant Nutrition Institute, Primera . Quito-Ecuador,1999. pp. 1-46. Consulta: 29 julio 2018]. Disponible en: <http://www.cia.ucr.ac.cr/pdf/libros/Acidez%20y%20encalado%20de%20suelos,%20libro%20por%20J%20Espinosa%20y%20E%20Molina.pdf>

Flores, Carlos Santiago y Mendoza, Jorge Patricio. 2017. *Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos por derrames de la Estación de Servicio en el Campamento de Guarumales-CELEC.* [En línea]Cuenca-Ecuador : Univerdiada de Cuenca, 2017,pp.24-25 [Consulta: 29 julio 2018]. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/27211>

Instituto Politécnico Nacional . *Efecto de la temperatura y ph sobre los microorganismos.* [En línea] 2017,p.36. [Consulta: 23 de Septiembre de 2018].[Disponible en: <http://es.slideshare.net/iltaitDes/efecto-de-la-temperatura-y-ph-sobre-los-microorganismos-76430168>

Jiménez, Rita Guadalupe y Paucar, Juan Fernando. *Estudio del comportamiento del sistema de reinyección de agua del campo Libertador. Quito.* [en línea]. Escuela Politécnica Nacional: Facultad de Ingeniería en Geología y Petróleos, 2011 p.1 [Consulta: 20 julio 2018]. Disponible en: <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/3739/1/CD-3536.pdf>

Martínez, V. *Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso.* s.l. : [en línea]. Terra Latinoamericana, Vol. 19. no.01, 2001. pp. 9-17. ISSN 01206230. 1 [Consulta: 20 julio 2018]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57319102>

Miranda Freire, Jorge Lenin. *"Aislamiento, Identificación y Elaboración de un consorcio bacteriano para biorremediación de aguas y sedimentos contaminados provenientes del residual de las muestras ingresadas al LAB-CESTTA".* [en línea]. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2015. pp. 6-7-. [Consulta 20 julio 2018]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4062>

Muñoz, Jim Maycol y Pacheco, Mabel. *Colonias bacterianas presentes en el estiércol de gallinas blancas de la cepa Leghron responsables de la biodegradación de Petróleos en suelos contaminados.* [en línea]. Lima-Perú: Universidad Wiener: Facultad de farmacia y Bioquímica, 2017. pp. 18-20. [Consulta 20 julio 2018]. Disponible en:
[%20PACHECO%20MIRANDA%20MABEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y](#)

Reatiqui, Jhony. *Perforación I.* Cuenca : Escuela Politécnica Nacional, [en línea]. Cuenca: Escuela Politécnica Nacional, 2015. pp. 133-134. [Consulta 10 julio 2018].
Disponible en: <https://issuu.com/jhonnyreatiqui/docs/reatiqui-jhonny>

Revelo, Imelda Suleidy y Montesdeoca, Espin Eduardo. *Diseño de Tanques, usados en la separación del agua de formación para el proceso de reinyección, Estación Secoya.*[En línea]. Quito: Universidad Central del Ecuador, 2015 p27. [Consulta: 20 julio 2018] .Disponible en:
<http://www.dspace.uce.edu.ec:8080/bitstream/25000/4515/1/T-UCE-0017-115.pdf>

Rodríguez, Lissette Paola. *Evaluación de dos sustratos en la Técnica de Landfarming para el tratamiento de suelos contaminados con Hidrocarburos.* [En línea]. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2008, pp.26-27. [Consulta 22 julio 2018]. Disponible en:
<http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/227/1/236T0011.pdf>

Simbaña, Carlos Julio. *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de la parroquia Taracoa en Francisco de Orellana, mediante el Hongo Pleurotus Ostreatus.*[En línea].Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2016, pp.1-2. [Consulta 20 julio 2018]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/4916>

Suarez, Roland Mauricio. *Guía de Métodos de Biorremediación para la Recuperación De Suelos Contaminados por Hidrocarburos.* [En línea]. Bogotá D.C: Universidad Libre: Instituto de Posgrado Ingeniería especialización en Gerencia Ambiental, 2013, pp. 28-29.
[Consulta 20 julio 2018]. Disponible en:
<https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/10607/TRABAJO%20FINAL%20cd.pdf?sequence=1>

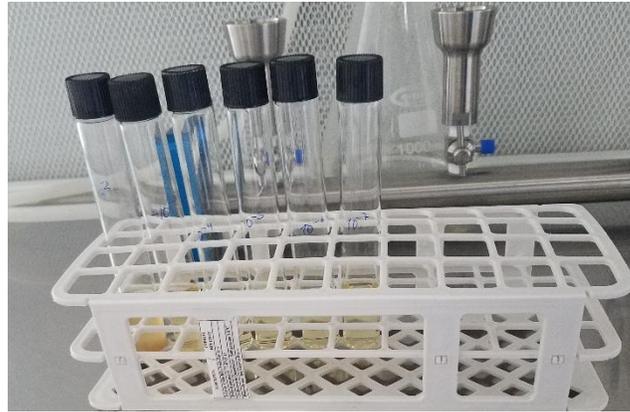
Tesis de investigadores . *La catalasa (enzima)*. [En línea] 2011,p.1 [Consulta: 23 de Septiembre de 2018.] .Disponible en:
<http://tesisdeinvestigadores.blogspot.com/2011/05/la-catalasa-enzima.html>.

TULSMA. *Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados*. Quito-Ecuador : [En línea] Asamblea del Ecuador,. 2003 pp. 14-16. [Consulta: 23 de Septiembre de 2018.] .Disponible en: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu112181.pdf>

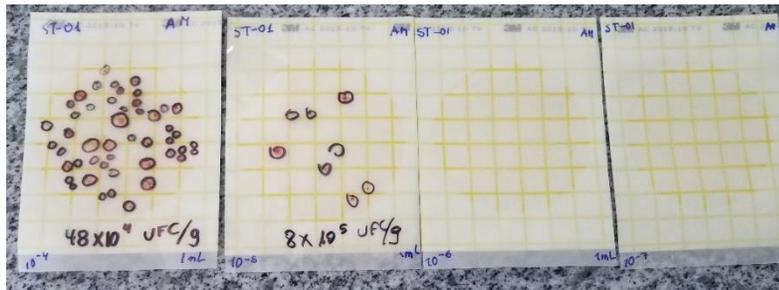
TULSMA. Libro VI ANEXO 2A. *Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados* . [En línea] Quito - Ecuador : Registro oficial suplemento 2 ,2003.[Consulta: 23 de Septiembre de 2018.] .Disponible en:
<http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu112181.pdf>

ANEXOS

Anexos A: Preparación de las diluciones sucesivas.



Anexos B: Conteo de microorganismos.



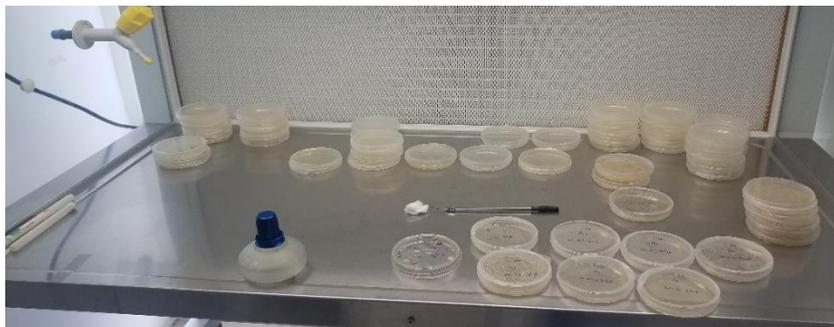
Anexos C: Inoculación de las diluciones en cada caja Petri.



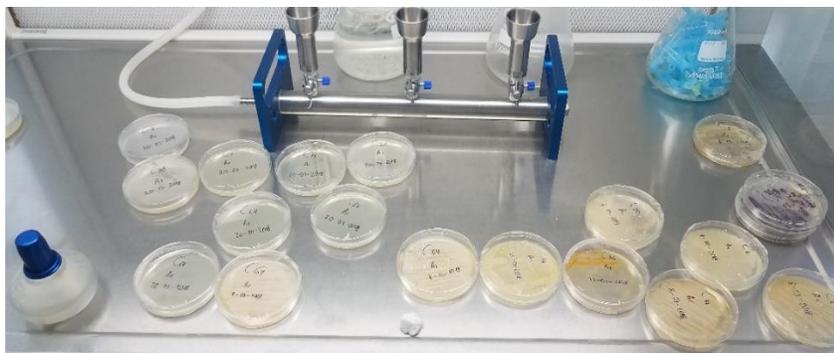
Anexos D: Identificación de cada cepa bacteriana.



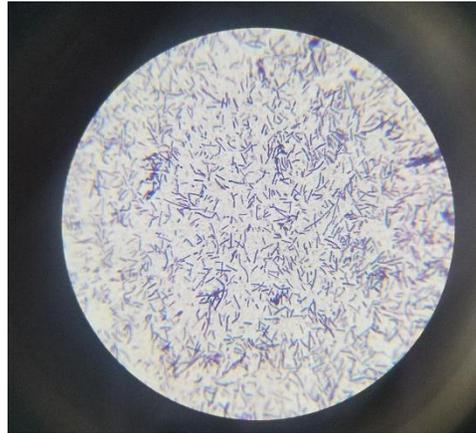
Anexos E: Siembra de las cepas bacterianas seleccionadas en cada caja Petri.



Anexos F: Clasificación de las Cepas bacterianas



Anexos G: Observación de placas al microscopio.



Anexos H : Realización de la Prueba Catalasa.



Anexos I: Dosificación de cada cepa bacteriana en los tubos eppendorf.



Anexos J: Dosificación en los matraces con sus respectivas cepas bacterianas más el medio mínimo.



Anexos K: Dosificación de petróleo en los matraces con cepas bacterianas.



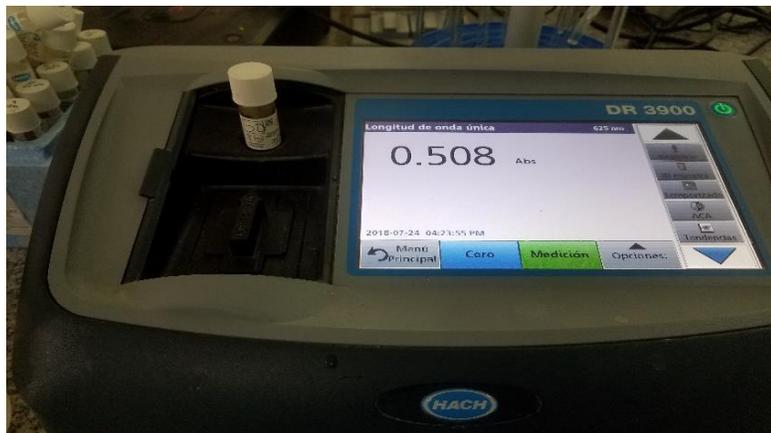
Anexos L: Agitación de los matraces



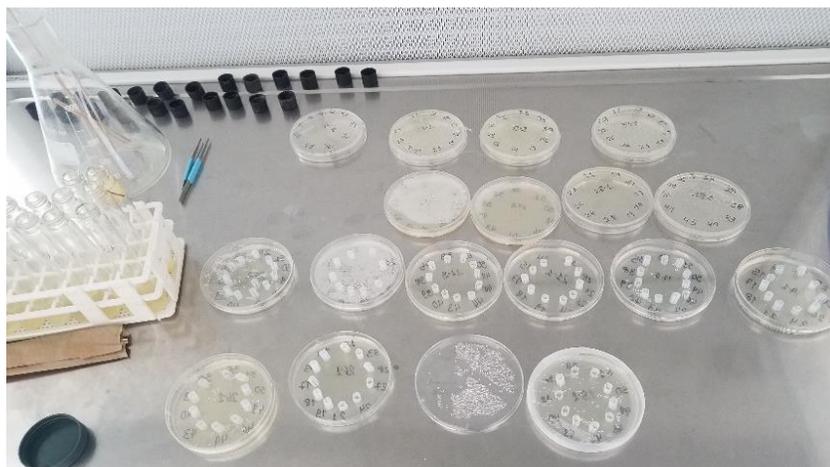
Anexos M: Observación de la degradación de hidrocarburos.



Anexos N: Lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro.



Anexos O: Siembra de las cepas bacterianas para la prueba de antagonismo.



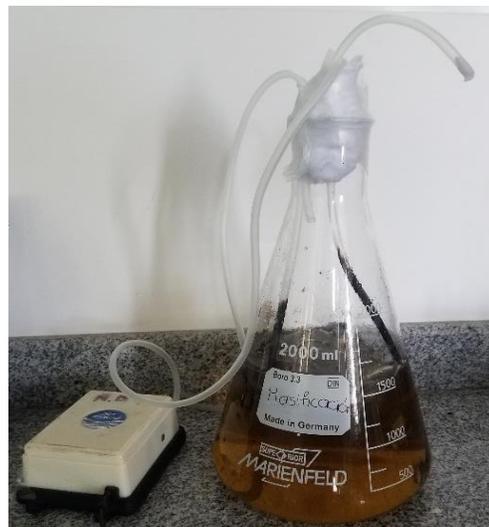
Anexos P: Identificación de las cepas antagonicas.



Anexos Q: Selección de las 10 cepas bacterianas para el consorcio bacteriano



Anexos R: Elaboración del inóculo para la siembra



Anexos S: Siembra del inóculo al suelo contaminado



Anexos T: Suelo en proceso de Biorremediación



Anexos U: Tabla 2- Criterios de Calidad de Suelo

Tabla 2: Criterios de la Calidad del Suelo

Sustancia	Unidades (Concentración en Peso Seco)	Suelo
PARÁMETROS GENERALES		
Conductividad	mmhos/cm	2
pH		6 a 8
Relación de Adsorción de Sodio (Índice SAR)		4
PARÁMETROS INORGÁNICOS		
Arsénico (inorgánico)	mg/kg	5
Azufre (elemental)	mg/kg	250
Bario	mg/kg	200
Boro (soluble en agua caliente)	mg/kg	1
Cadmio	mg/kg	0.5
Cobalto	mg/kg	10
Cobre	mg/kg	30
Cromo Total	mg/kg	20
Cromo VI	mg/kg	2.5
Cianuro (libre)	mg/kg	0.25
Estaño	mg/kg	5
Flúor (total)	mg/kg	200
Mercurio	mg/kg	0.1
Molibdeno	mg/kg	2
Níquel	mg/kg	20
Plomo	mg/kg	25
Selenio	mg/kg	1
Vanadio	mg/kg	25
Zinc	mg/kg	60
Parámetros Orgánicos		
Benceno	mg/kg	0.05
Clorobenceno	mg/kg	0.1
Etilbenceno	mg/kg	0.1
Estireno	mg/kg	0.1
Tolueno	mg/kg	0.1
Xileno	mg/kg	0.1
PCBs	mg/kg	0.1
Clorinados Alifáticos (cada tipo)	mg/kg	0.1
Clorobencenos (cada tipo)	mg/kg	0.05
Hexanoclorobenceno	mg/kg	0.1

Hexaclorociclohexano	mg/kg	0.01
Fenólicos no clorinados (cada tipo)	mg/kg	0.1
Clorofenoles (cada tipo)	mg/kg	0.05
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) cada tipo	mg/kg	0.1

Fuente: (TULSMA, Libro VI ANEXO 2A, 2003)

Anexos V: Tabla 3- Criterios de Remediación o Restauración del Suelo

TABLA 3: Criterios de Remediación o Restauración del Suelo

Sustancia		Unidades		USO DEL SUELO	
	(Concentración en Peso Seco)	Agrícola	Residencial	Comercial	Industrial
Parámetros Generales					
Conductividad	mmhos/cm.	2	2	4	4
pH		6 a 8	6 a 8	6 a 8	6 a 8
Parámetros Inorgánicos					
Arsénico (Inorgánico)	mg/kg	12	15	15	14
Azufre (elemental)	mg/kg	500	-	-	-
Bario	mg/kg	750	500	2000	2000
Boro (soluble en agua caliente)	mg/kg	2	-	-	-
Cadmio	mg/kg	2	5	10	10
Cobalto	mg/kg	40	50	300	300
Cobre	mg/kg	63	63	91	91
Cromo Total	mg/kg	65	65	90	90
Cromo VI	mg/kg	0.4	0.4	1.4	1.4
Cianuro (libre)	mg/kg	0.9	0.9	8.0	8.0
Estaño	mg/kg	5	50	300	300
Flúor (total)	mg/kg	200	400	2000	2000
Mercurio (inorgánico)	mg/kg	0.8	2	10	10
Molibdeno	mg/kg	5	10	40	40
Níquel	mg/kg	50	100	100	100
Plata	mg/kg	20	20	40	40
Plomo	mg/kg	100	100	150	150
Selenio	mg/kg	2	3	10	10
Talio	mg/kg	1	1	1	1
Vanadio	mg/kg	130	130	130	130
Zinc	mg/kg	200	200	380	380
Parámetros orgánicos					
Aceites y Grasas	mg/kg	500	<2500	<4000	<4000
Hidrocarburos Aromáticos					
Monocíclicos					
Benceno	mg/kg	0.05	0.5	5	5
Etilbenceno	mg/kg	0.1	1.2	20	20
Estireno	mg/kg	0.1	5	50	50
Tolueno	mg/kg	0.1	0.8	0.8	0.8

Xileno	mg/kg	0.1	1	17	20
Compuestos Fenólicos					
Clorofenoles(cada uno)	mg/kg	0.05	0.5	5	5
Fenoles (total)	mg/kg	3.8	3.8	3.8	3.8
Hidrocarburos Aromáticos policíclicos					
Benzo(a) antraceno	mg/kg	0.1	1	1	1
Benzo(a) pirenos	mg/kg	0.1	0.7	0.7	0.7
Naftaleno	mg/kg	0.1	0-6	22	22
Pirenos	mg/kg	0.1	10	10	10
Hidrocarburos Clorinados					
Bifenilospoli-clorados (PCBs)total	mg/kg	0.5	1.3	33	33
Clorinados Alifáticos (cada uno)	mg/kg	0.1	5	50	50
Clorobencenos (cada uno)	mg/kg	0.05	2	10	10
Tetracloroetilenos	mg/kg	0.1	0.2	0.5	0.6
Tricloroetileno	mg/kg	0.1	3	30	30
Pesticidas					
Pesticidas organoclorados y sus Metabolitos totales, Aldrin,Deldrin,Clordano,DDT (total) ,Endosulfan(total).	mg/kg	0.1	0.1	0.1	0.1
Endrin (total)	mg/kg	0.01	0.01	0.01	0.01
Heptacloro	mg/kg	0.01	0.01	0.01	0.01
Hexaclorociclohexano (todos los isómeros)	mg/kg	0.01	0.01	0.01	0.01
Atrazina	mg/kg	0.005	0.005	0.005	0.005
Carbofuran orgánicos	mg/kg	0.01	0.01	0.01	0.01
Misceláneos					
Alifáticos Clorinados (cada uno)	mg/kg	0.3	-	-	-

Fuente: (TULSMA, 2003).

Anexos W: Tabla de Cuantiles de la distribución de Tukey.

Tabla 8: Cuantiles de la distribución de Tukey $q(n, m)$

0.05	n													
m	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
2	6.08	8.33	9.80	10.88	11.73	12.43	13.03	13.54	13.99	14.40	14.76	15.09	15.39	15.67
3	4.50	5.91	6.82	7.50	8.04	8.48	8.85	9.18	9.46	9.72	9.95	10.15	10.35	10.52
4	3.93	5.04	5.76	6.29	6.71	7.05	7.35	7.60	7.83	8.03	8.21	8.37	8.52	8.66
5	3.64	4.60	5.22	5.67	6.03	6.33	6.58	6.80	6.99	7.17	7.32	7.47	7.60	7.72
6	3.46	4.34	4.90	5.30	5.63	5.90	6.12	6.32	6.49	6.65	6.79	6.92	7.03	7.14
7	3.34	4.16	4.68	5.06	5.36	5.61	5.82	6.00	6.16	6.30	6.43	6.56	6.66	6.76
8	3.26	4.04	4.53	4.89	5.17	5.40	5.60	5.77	5.92	6.05	6.18	6.29	6.39	6.48
9	3.20	3.95	4.41	4.76	5.02	5.24	5.43	5.59	5.74	5.87	5.98	6.09	6.19	6.28
10	3.15	3.88	4.33	4.65	4.91	5.12	5.30	5.46	5.60	5.72	5.83	5.93	6.03	6.11
11	3.11	3.82	4.26	4.57	4.82	5.03	5.20	5.35	5.49	5.61	5.71	5.81	5.90	5.98
12	3.08	3.77	4.20	4.51	4.75	4.95	5.12	5.27	5.39	5.51	5.61	5.71	5.80	5.88
13	3.06	3.73	4.15	4.45	4.69	4.88	5.05	5.19	5.32	5.43	5.53	5.63	5.71	5.79
14	3.03	3.70	4.11	4.41	4.64	4.83	4.99	5.13	5.25	5.36	5.46	5.55	5.64	5.71
15	3.01	3.67	4.08	4.37	4.59	4.78	4.94	5.08	5.20	5.31	5.40	5.49	5.57	5.65
16	3.00	3.65	4.05	4.33	4.56	4.74	4.90	5.03	5.15	5.26	5.35	5.44	5.52	5.59
17	2.98	3.63	4.02	4.30	4.52	4.70	4.86	4.99	5.11	5.21	5.31	5.39	5.47	5.54
18	2.97	3.61	4.00	4.28	4.49	4.67	4.82	4.96	5.07	5.17	5.27	5.35	5.43	5.50
19	2.96	3.59	3.98	4.25	4.47	4.65	4.79	4.92	5.04	5.14	5.23	5.31	5.39	5.46
20	2.95	3.58	3.96	4.23	4.45	4.62	4.77	4.90	5.01	5.11	5.20	5.28	5.36	5.43
21	2.94	3.56	3.94	4.21	4.42	4.60	4.74	4.87	4.98	5.08	5.17	5.25	5.33	5.40
22	2.93	3.55	3.93	4.20	4.41	4.58	4.72	4.85	4.96	5.06	5.14	5.23	5.30	5.37
23	2.93	3.54	3.91	4.18	4.39	4.56	4.70	4.83	4.94	5.03	5.12	5.20	5.27	5.34
24	2.92	3.53	3.90	4.17	4.37	4.54	4.68	4.81	4.92	5.01	5.10	5.18	5.25	5.32
25	2.91	3.52	3.89	4.15	4.36	4.53	4.67	4.79	4.90	4.99	5.08	5.16	5.23	5.30
26	2.91	3.51	3.88	4.14	4.35	4.51	4.65	4.77	4.88	4.98	5.06	5.14	5.21	5.28
27	2.90	3.51	3.87	4.13	4.33	4.50	4.64	4.76	4.86	4.96	5.04	5.12	5.19	5.26
28	2.90	3.50	3.86	4.12	4.32	4.49	4.62	4.74	4.85	4.94	5.03	5.11	5.18	5.24
29	2.89	3.49	3.85	4.11	4.31	4.47	4.61	4.73	4.84	4.93	5.01	5.09	5.16	5.23
30	2.89	3.49	3.85	4.10	4.30	4.46	4.60	4.72	4.82	4.92	5.00	5.08	5.15	5.21
31	2.88	3.48	3.84	4.09	4.29	4.45	4.59	4.71	4.81	4.90	4.99	5.06	5.13	5.20
32	2.88	3.48	3.83	4.09	4.28	4.45	4.58	4.70	4.80	4.89	4.98	5.05	5.12	5.18
33	2.88	3.47	3.83	4.08	4.28	4.44	4.57	4.69	4.79	4.88	4.97	5.04	5.11	5.17
34	2.87	3.47	3.82	4.07	4.27	4.43	4.56	4.68	4.78	4.87	4.96	5.03	5.10	5.16
35	2.87	3.46	3.81	4.07	4.26	4.42	4.56	4.67	4.77	4.86	4.95	5.02	5.09	5.15
36	2.87	3.46	3.81	4.06	4.25	4.41	4.55	4.66	4.76	4.85	4.94	5.01	5.08	5.14
37	2.87	3.45	3.80	4.05	4.25	4.41	4.54	4.65	4.75	4.85	4.93	5.00	5.07	5.13
38	2.86	3.45	3.80	4.05	4.24	4.40	4.53	4.65	4.75	4.84	4.92	4.99	5.06	5.12
39	2.86	3.45	3.79	4.04	4.24	4.39	4.53	4.64	4.74	4.83	4.91	4.98	5.05	5.11
40	2.86	3.44	3.79	4.04	4.23	4.39	4.52	4.63	4.73	4.82	4.90	4.98	5.04	5.11
41	2.86	3.44	3.79	4.03	4.23	4.38	4.51	4.63	4.73	4.82	4.90	4.97	5.04	5.10
42	2.85	3.44	3.78	4.03	4.22	4.38	4.51	4.62	4.72	4.81	4.89	4.96	5.03	5.09
43	2.85	3.43	3.78	4.03	4.22	4.37	4.50	4.62	4.72	4.80	4.88	4.96	5.02	5.08
44	2.85	3.43	3.78	4.02	4.21	4.37	4.50	4.61	4.71	4.80	4.88	4.95	5.02	5.08
45	2.85	3.43	3.77	4.02	4.21	4.36	4.49	4.61	4.70	4.79	4.87	4.94	5.01	5.07
46	2.85	3.42	3.77	4.01	4.20	4.36	4.49	4.60	4.70	4.79	4.87	4.94	5.00	5.06
47	2.85	3.42	3.77	4.01	4.20	4.36	4.48	4.60	4.69	4.78	4.86	4.93	5.00	5.06
48	2.84	3.42	3.76	4.01	4.20	4.35	4.48	4.59	4.69	4.78	4.86	4.93	4.99	5.05
49	2.84	3.42	3.76	4.00	4.19	4.35	4.48	4.59	4.69	4.77	4.85	4.92	4.99	5.05
50	2.84	3.42	3.76	4.00	4.19	4.34	4.47	4.58	4.68	4.77	4.85	4.92	4.98	5.04

Tabla 8: Cuantiles de la distribución de Tukey $q(n, m)$

$\alpha = 0.05$	n														
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
m															
2	15.92	16.16	16.38	16.59	16.78	16.97	17.14	17.30	17.46	17.61	17.75	17.88	18.01	18.13	18.25
3	10.69	10.84	10.98	11.11	11.24	11.36	11.47	11.58	11.68	11.78	11.87	11.96	12.05	12.13	12.21
4	8.79	8.91	9.03	9.13	9.23	9.33	9.42	9.50	9.58	9.66	9.74	9.81	9.88	9.94	10.00
5	7.83	7.93	8.03	8.12	8.21	8.29	8.37	8.44	8.51	8.58	8.64	8.70	8.76	8.82	8.87
6	7.24	7.34	7.43	7.51	7.59	7.66	7.73	7.80	7.86	7.92	7.98	8.03	8.09	8.14	8.19
7	6.85	6.94	7.02	7.10	7.17	7.24	7.30	7.36	7.42	7.48	7.53	7.58	7.63	7.68	7.73
8	6.57	6.65	6.73	6.80	6.87	6.93	6.99	7.05	7.11	7.16	7.21	7.26	7.31	7.35	7.40
9	6.36	6.44	6.51	6.58	6.64	6.70	6.76	6.82	6.87	6.92	6.97	7.02	7.06	7.10	7.14
10	6.19	6.27	6.34	6.40	6.47	6.53	6.58	6.63	6.69	6.73	6.78	6.82	6.87	6.91	6.95
11	6.06	6.13	6.20	6.27	6.33	6.38	6.44	6.49	6.54	6.58	6.63	6.67	6.71	6.75	6.79
12	5.95	6.02	6.09	6.15	6.21	6.26	6.32	6.37	6.41	6.46	6.50	6.54	6.58	6.62	6.66
13	5.86	5.93	5.99	6.05	6.11	6.17	6.22	6.26	6.31	6.36	6.40	6.44	6.48	6.52	6.55
14	5.79	5.85	5.91	5.97	6.03	6.08	6.13	6.18	6.22	6.27	6.31	6.35	6.39	6.42	6.46
15	5.72	5.78	5.85	5.90	5.96	6.01	6.06	6.10	6.15	6.19	6.23	6.27	6.31	6.34	6.38
16	5.66	5.73	5.79	5.84	5.90	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.17	6.20	6.24	6.28	6.31
17	5.61	5.67	5.73	5.79	5.84	5.89	5.94	5.98	6.03	6.07	6.11	6.14	6.18	6.22	6.25
18	5.57	5.63	5.69	5.74	5.79	5.84	5.89	5.93	5.98	6.02	6.06	6.09	6.13	6.16	6.20
19	5.53	5.59	5.65	5.70	5.75	5.80	5.85	5.89	5.93	5.97	6.01	6.05	6.08	6.11	6.15
20	5.49	5.55	5.61	5.66	5.71	5.76	5.81	5.85	5.89	5.93	5.97	6.00	6.04	6.07	6.10
21	5.46	5.52	5.58	5.63	5.68	5.73	5.77	5.81	5.85	5.89	5.93	5.97	6.00	6.03	6.07
22	5.43	5.49	5.55	5.60	5.65	5.69	5.74	5.78	5.82	5.86	5.90	5.93	5.97	6.00	6.03
23	5.41	5.46	5.52	5.57	5.62	5.67	5.71	5.75	5.79	5.83	5.87	5.90	5.93	5.97	6.00
24	5.38	5.44	5.49	5.55	5.59	5.64	5.68	5.72	5.76	5.80	5.84	5.87	5.91	5.94	5.97
25	5.36	5.42	5.47	5.52	5.57	5.62	5.66	5.70	5.74	5.78	5.81	5.85	5.88	5.91	5.94
26	5.34	5.40	5.45	5.50	5.55	5.59	5.64	5.68	5.72	5.75	5.79	5.82	5.85	5.89	5.92
27	5.32	5.38	5.43	5.48	5.53	5.57	5.61	5.66	5.69	5.73	5.77	5.80	5.83	5.86	5.89
28	5.30	5.36	5.41	5.46	5.51	5.55	5.60	5.64	5.67	5.71	5.75	5.78	5.81	5.84	5.87
29	5.29	5.34	5.40	5.44	5.49	5.54	5.58	5.62	5.66	5.69	5.73	5.76	5.79	5.82	5.85
30	5.27	5.33	5.38	5.43	5.47	5.52	5.56	5.60	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.80	5.83
31	5.26	5.31	5.36	5.41	5.46	5.50	5.54	5.58	5.62	5.66	5.69	5.72	5.76	5.79	5.82
32	5.24	5.30	5.35	5.40	5.45	5.49	5.53	5.57	5.61	5.64	5.68	5.71	5.74	5.77	5.80
33	5.23	5.29	5.34	5.39	5.43	5.48	5.52	5.56	5.59	5.63	5.66	5.69	5.73	5.76	5.78
34	5.22	5.27	5.33	5.37	5.42	5.46	5.50	5.54	5.58	5.61	5.65	5.68	5.71	5.74	5.77
35	5.21	5.26	5.31	5.36	5.41	5.45	5.49	5.53	5.57	5.60	5.64	5.67	5.70	5.73	5.76
36	5.20	5.25	5.30	5.35	5.40	5.44	5.48	5.52	5.55	5.59	5.62	5.66	5.69	5.72	5.74
37	5.19	5.24	5.29	5.34	5.39	5.43	5.47	5.51	5.54	5.58	5.61	5.64	5.67	5.70	5.73
38	5.18	5.23	5.28	5.33	5.38	5.42	5.46	5.50	5.53	5.57	5.60	5.63	5.66	5.69	5.72
39	5.17	5.22	5.27	5.32	5.37	5.41	5.45	5.49	5.52	5.56	5.59	5.62	5.65	5.68	5.71
40	5.16	5.22	5.27	5.31	5.36	5.40	5.44	5.48	5.51	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.70
41	5.15	5.21	5.26	5.30	5.35	5.39	5.43	5.47	5.50	5.54	5.57	5.60	5.63	5.66	5.69
42	5.15	5.20	5.25	5.30	5.34	5.38	5.42	5.46	5.50	5.53	5.56	5.59	5.62	5.65	5.68
43	5.14	5.19	5.24	5.29	5.33	5.37	5.41	5.45	5.49	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67
44	5.13	5.19	5.24	5.28	5.33	5.37	5.41	5.44	5.48	5.51	5.55	5.58	5.61	5.64	5.66
45	5.13	5.18	5.23	5.28	5.32	5.36	5.40	5.44	5.47	5.51	5.54	5.57	5.60	5.63	5.66
46	5.12	5.17	5.22	5.27	5.31	5.35	5.39	5.43	5.46	5.50	5.53	5.56	5.59	5.62	5.65
47	5.11	5.17	5.22	5.26	5.31	5.35	5.39	5.42	5.46	5.49	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64
48	5.11	5.16	5.21	5.26	5.30	5.34	5.38	5.42	5.45	5.48	5.52	5.55	5.58	5.61	5.63
49	5.10	5.16	5.20	5.25	5.29	5.33	5.37	5.41	5.44	5.48	5.51	5.54	5.57	5.60	5.63
50	5.10	5.15	5.20	5.24	5.29	5.33	5.37	5.40	5.44	5.47	5.50	5.53	5.56	5.59	5.62

ANEXO X: Informes de los resultados de la caracterización del suelo

	CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL	LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL SAE
	DEPARTAMENTO : SERVICIOS DE LABORATORIO	ACREDITACIÓN Nº OAE LE 2C 06-008
	Panamericana Sur Km. 1 ½, ESPOCH (Facultad de Ciencias) RIOBAMBA - ECUADOR Telefax: (03) 3013183	

INFORME DE ENSAYO No: ST-001-18
ST: 001-18 ANÁLISIS DE SUELOS
Nombre Peticionario: TESIS DE PREGRADO
Atm. Edga. Paola Rodriguez
Dirección: NA
 Riobamba-Chimborazo
FECHA: 16 de Febrero del 2018
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2018/02/06- 12:00
FECHA DE MUESTREO: 2018/02/05- 15:00
FECHA DE ANÁLISIS: 2018/02/06 -2018/02/16
TIPO DE MUESTRA: Suelo
CÓDIGO CESTTA: LAB-ST 001-18
CÓDIGO DE LA EMPRESA: S-1
PUNTO DE MUESTREO: Estación Secoya
ANALISIS SOLICITADO: Físico-Químico-Microbiológico
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Ing. Ghinson Guevara
CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS: T máx.:25,0 °C. T mín.: 15,0 °C

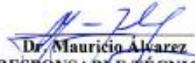
RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	INCERTIDUMBRE (k=2)	VALOR LÍMITE PERMISIBLE
*Cadmio	PEE/CESTTA/197 EPA SW-846 3051A/6010D	mg/Kg	1,7	-	-
*Níquel	PEE/CESTTA/197 EPA SW-846 3051A/6010D	mg/Kg	6,3	-	-
*Plomo	PEE/CESTTA/197 EPA SW-846 3051A/6010D	mg/Kg	10	-	-
Hidrocarburos Totales	PEE/CESTTA/26 TNRCC 1005	mg/Kg	53696,27	± 11%	-
*Nitrógeno total	PEE/CESTTA/88 Kjeldhal	%	0,92	-	-
Potencial de Hidrogeno	PEE/CESTTA/24 EPA 9045 D	Unidades de pH	7,8	± 0,4	-
*Humedad	PEE/CESTTA/80 ASTM D4959	%	78,8	-	-
*Aerobios totales	Recuento de placas	UFC/g	8*10 ⁵	-	-

OBSERVACIONES:

- Muestra transportada en refrigeración.
- La columna: Valor límite permisible, está fuera del alcance de la acreditación del SAE.
- "Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE".

RESPONSABLES DEL INFORME:


Dr. Mauricio Alvarez
 RESPONSABLE TÉCNICO





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

**DEPARTAMENTO :
SERVICIOS DE LABORATORIO**

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



Servicio de
Acreditación
Ecuatoriano

**Acreditación N° OAE LE 2C 06-008
LABORATORIO DE ENSAYOS**

INFORME DE ENSAYO No: ST-002-18
ST: 002- 18 ANÁLISIS DE SUELOS
Nombre Peticionario: TESIS DE PREGRADO
Atm: Edga. Paola Rodríguez
Dirección: NA
Riobamba-Chimborazo
13 de Septiembre del 2018
FECHA: 1
NUMERO DE MUESTRAS: 2018/09/03- 10:50
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2018/09/03- 10:10
FECHA DE MUESTREO: 2018/08/03 -2018/09/13
FECHA DE ANÁLISIS: Suelo
TIPO DE MUESTRA: LAB-ST 002-18
CÓDIGO CESTTA: TA
CÓDIGO DE LA EMPRESA: LABORATORIO CESTTA
PUNTO DE MUESTREO: Hidrocarburos Totales
ANALISIS SOLICITADO: Edga. Paola Rodríguez
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: T máx.:25,0 °C. T min.: 15,0 °C
CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS:

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	INCERTIDUMBRE (k=2)	VALOR LÍMITE PERMISIBLE
Hidrocarburos Totales	PEE/CESTTA/26 TNRCC 1005	mg/Kg	15959,32	± 13%	-

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.
- La columna: Valor límite permisible, está fuera del alcance de la acreditación del SAE.

RESPONSABLES DEL INFORME:


Dr. Mauricio Alvarez
RESPONSABLE TÉCNICO





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

**DEPARTAMENTO :
SERVICIOS DE LABORATORIO**

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



Servicio de
Acreditación
Ecuatoriano

**Acreditación N° OAE LE 2C 06-008
LABORATORIO DE ENSAYOS**

INFORME DE ENSAYO No: ST-003-18
ST: 002-18 ANÁLISIS DE SUELOS
Nombre Peticionario: TESIS DE PREGRADO
Atn. Edga. Paola Rodriguez
Dirección: NA
Riobamba-Chimborazo
FECHA: 13 de Septiembre del 2018
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2018/09/03- 10:50
FECHA DE MUESTREO: 2018/09/03- 10:20
FECHA DE ANÁLISIS: 2018/08/03 -2018/09/13
TIPO DE MUESTRA: Suelo
CÓDIGO CESTTA: LAB-ST 003-18
CÓDIGO DE LA EMPRESA: TB
PUNTO DE MUESTREO: LABORATORIO CESTTA
ANÁLISIS SOLICITADO: Hidrocarburos Totales
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Edga. Paola Rodriguez
CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS: T máx.:25,0 °C. T mín.: 15,0 °C

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	INCERTIDUMBRE (k=2)	VALOR LIMITE PERMISIBLE
Hidrocarburos Totales	PEE/CESTTA/26 TNRCC 1005	mg/Kg	10460,4	± 13%	-

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.
- La columna: Valor límite permisible, está fuera del alcance de la acreditación del SAE.

RESPONSABLES DEL INFORME:


Dr. Mauricio Alvarez
RESPONSABLE TÉCNICO





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

**DEPARTAMENTO :
SERVICIOS DE LABORATORIO**

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



Servicio de
Acreditación
Ecuatoriano

Acreditación N° OAE LE 20 06-008
LABORATORIO DE ENSAYOS

INFORME DE ENSAYO N°:

ST:

Nombre Peticionaria:

Atn.

Dirección:

FECHA:

NUMERO DE MUESTRAS:

FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:

FECHA DE MUESTREO:

FECHA DE ANÁLISIS:

TIPO DE MUESTRA:

CÓDIGO CESTTA:

CÓDIGO DE LA EMPRESA:

PUNTO DE MUESTREO:

ANÁLISIS SOLICITADO:

PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:

CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS:

ST-004-18

002-18 ANÁLISIS DE SUELOS

TESIS DE PREGRADO

Edga Paola Rodríguez

NA

Riobamba-Chimborazo

13 de Septiembre del 2018

1

2018/09/03 - 10:50

2018/09/03 - 10:30

2018/08/03 - 2018/09/13

Suelo

LAB-ST 004-18

TC

LABORATORIO CESTTA

Hidrocarburos Totales

Edga Paola Rodríguez

T máx.: 25,0 °C. T mín.: 15,0 °C

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	INCERTIDUMBRE (k=2)	VALOR LÍMITE PERMISIBLE
Hidrocarburos Totales	PEE/CESTTA/26 INRCC 1005	mg/Kg	49347,35	± 11%	-

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.
- La columna: Valor límite permisible, está fuera del alcance de la acreditación del SAE.

RESPONSABLES DEL INFORME:

Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO





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

**DEPARTAMENTO :
SERVICIOS DE LABORATORIO**

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

**LABORATORIO DE
ENSAYO
ACREDITADO POR
EL SAE**

**ACREDITACIÓN
Nº OAE LE 2C 06-008**

INFORME DE ENSAYO No:

ST:

Nombre Peticionario:

Atn.

Dirección:

ST-005-18

003- 18 ANÁLISIS DE SUELOS

TESIS DE PREGRADO

Edga. Paola Rodríguez

NA

Riobamba-Chimborazo

21 de Septiembre del 2018

1

FECHA:

NUMERO DE MUESTRAS:

FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:

FECHA DE MUESTREO:

FECHA DE ANÁLISIS:

TIPO DE MUESTRA:

CÓDIGO CESTTA:

CÓDIGO DE LA EMPRESA:

PUNTO DE MUESTREO:

ANÁLISIS SOLICITADO:

PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:

CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS:

2018/09/11- 12:20

2018/09/11- 11:30

2018/09/11 -2018/09/21

Suelo

LAB-ST 005-18

TA

LABORATORIO CESTTA

Físico-Químico-Microbiológico

Edga. Paola Rodríguez

T máx.:25,0 °C. T mín.: 15,0 °C

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	INCERTIDUMBRE (k=2)	VALOR LÍMITE PERMISIBLE
*Cadmio	PEE/CESTTA/197 EPA SW-846 3051A/6010D	mg/Kg	0,23	-	-
*Niquel	PEE/CESTTA/197 EPA SW-846 3051A/6010D	mg/Kg	1,74	-	-
*Plomo	PEE/CESTTA/197 EPA SW-846 3051A/6010D	mg/Kg	5,73	-	-
Hidrocarburos Totales	PEE/CESTTA/26 TNRCC 1005	mg/Kg	12517,39	± 13%	-
*Nitrógeno total	PEE/CESTTA/88 Kjeldhal	%	1,46	-	-
Potencial de Hidrogeno	PEE/CESTTA/24 EPA 9045 D	Unidades de pH	7,77	± 0,4	-
*Humedad	PEE/CESTTA/80 ASTM D4959	%	59,64	-	-
*Aerobios totales	Recuento de placas	UFC/g	5*10 ⁷	-	-

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.
- La columna: Valor limite permisible, está fuera del alcance de la acreditación del SAE.
- "Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE".

RESPONSABLES DEL INFORME:


Dr. Mauricio Alvarez
RESPONSABLE TÉCNICO





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

**DEPARTAMENTO :
SERVICIOS DE LABORATORIO**

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

**LABORATORIO DE
ENSAYO
ACREDITADO POR
EL SAE**

**ACREDITACIÓN
Nº OAE LE 2C 06-008**

INFORME DE ENSAYO No:

ST:

Nombre Peticionario:

Atn.

Dirección:

ST-006-18

003-18 - ANÁLISIS DE SUELOS

TESIS DE PREGRADO

Edga. Paola Rodríguez

NA

Riobamba-Chimborazo

21 de Septiembre del 2018

1

FECHA:

NUMERO DE MUESTRAS:

FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:

FECHA DE MUESTREO:

FECHA DE ANÁLISIS:

TIPO DE MUESTRA:

CÓDIGO CESTTA:

CÓDIGO DE LA EMPRESA:

PUNTO DE MUESTREO:

ANÁLISIS SOLICITADO:

PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:

CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS:

2018/09/11- 12:20

2018/09/11- 11:40

2018/09/11-2018/09/21

Suelo

LAB-ST 006-18

TB

LABORATORIO CESTTA

Físico-Químico-Microbiológico

Edga. Paola Rodríguez

T máx.:25,0 °C. T mín.: 15,0 °C

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	INCERTIDUMBRE (k=2)	VALOR LÍMITE PERMISIBLE
*Cadmio	PEE/CESTTA/197 EPA SW-846 3051A/6010D	mg/Kg	0,28	-	-
*Níquel	PEE/CESTTA/197 EPA SW-846 3051A/6010D	mg/Kg	2,69	-	-
*Plomo	PEE/CESTTA/197 EPA SW-846 3051A/6010D	mg/Kg	3,59	-	-
Hidrocarburos Totales	PEE/CESTTA/26 TNRCC 1005	mg/Kg	7517,76	± 14%	-
*Nitrógeno total	PEE/CESTTA/88 Kjeldhal	%	1,13	-	-
Potencial de Hidrogeno	PEE/CESTTA/24 EPA 9045 D	Unidades de pH	7,76	± 0,4	-
*Humedad	PEE/CESTTA/80 ASTM D4959	%	53,9	-	-
*Aerobios totales	Recuento de placas	UFC/g	6,1*10 ⁷	-	-

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.
- La columna: Valor limite permisible, está fuera del alcance de la acreditación del SAE.
- *Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE*.

RESPONSABLES DEL INFORME:


Dr. Mauricio Ayañez
RESPONSABLE TÉCNICO





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

**DEPARTAMENTO :
SERVICIOS DE LABORATORIO**

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

**LABORATORIO DE
ENSAYO
ACREDITADO POR
EL SAE**

**ACREDITACIÓN
Nº OAE LE 2C 06-008**

INFORME DE ENSAYO Nº: ST-006-18
ST: 003- 18 ANÁLISIS DE SUELOS
Nombre Peticionario: TESIS DE PREGRADO
Atn. Edga Paola Rodríguez
Dirección: NA
Riobamba-Chimborazo
FECHA: 21 de Septiembre del 2018
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2018/09/11- 12:20
FECHA DE MUESTREO: 2018/09/11- 11:50
FECHA DE ANÁLISIS: 2018/09/11-2018/09/21
TIPO DE MUESTRA: Suelo
CÓDIGO CESTTA: LAB-ST 007-18
CÓDIGO DE LA EMPRESA: TC
PUNTO DE MUESTREO: LABORATORIO CESTTA
ANÁLISIS SOLICITADO: Físico-Químico-Microbiológico
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Edga Paola Rodríguez
CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS: T máx.:25,0 °C. T mín.: 15,0 °C

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	INCERTIDUMBRE (k=2)	VALOR LÍMIT PERMISIBLE
*Cadmio	PEE/CESTTA/197 EPA SW-846 3051A/6010D	mg/Kg	0,66	-	-
*Níquel	PEE/CESTTA/197 EPA SW-846 3051A/6010D	mg/Kg	5,37	-	-
*Plomo	PEE/CESTTA/197 EPA SW-846 3051A/6010D	mg/Kg	6,82	-	-
Hidrocarburos Totales	PEE/CESTTA/26 TNRCC 1005	mg/Kg	41834,19	± 11%	-
*Nitrógeno total	PEE/CESTTA/88 Kjeldhal	%	1,76	-	-
Potencial de Hidrogeno	PEE/CESTTA/24 EPA 9045 D	Unidades de pH	7,75	+ 0,4	-
*Humedad	PEE/CESTTA/80 ASTM D4959	%	56,7	-	-
*Aerobios totales	Recuento de placas	UFC/g	1,8*10 ⁷	-	-

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.
- La columna: Valor límite permisible, está fuera del alcance de la acreditación del SAE.
- "Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE".

RESPONSABLES DEL INFORME:

Dr. Mauricio Alvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

