



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“BIOAUMENTACIÓN MEDIANTE EL USO DE
MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS PARA EL
TRATAMIENTO DE SUELOS CONTAMINADOS CON
HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO”**

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar el grado académico de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: EDWIN GEOVANNY LICTA VEGA

DIRECTOR: KARINA PAREDES PÁLIZ PhD.

Riobamba – Ecuador

2020

©2020, Edwin Geovanny Licta Vega

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.

Yo, Licta Vega Edwin Geovanny, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y la empresa patrocinadora AqLab.

Riobamba, 18 de febrero de 2020.



Licta Vega Edwin Geovanny

CI: 0401795752

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

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo: Investigación **“BIOAUMENTACIÓN MEDIANTE EL USO DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS PARA EL TRATAMIENTO DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO”** realizado por el señor: **Licta Vega Edwin Geovanny**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dra. Yolanda Dolores Díaz Heredia PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		18/02/2020 -----
Dra. Karina Inés Paredes Páliz DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		18/02/2020 -----
Ing. Ana Rafaela Pacurucu Reyes MIEMBRO DEL TRIBUNAL		18/02/2020 -----

DEDICATORIA

A mis padres y hermano por ser mi guía, por brindarme su apoyo incondicional. A Mishell motivación e inspiración a lo largo de mi vida desde su temprana partida junto a Dios, fue y seguirá siendo mi motivo e inspiración al enfrentarme a las vicisitudes de la vida.

Edwin

AGRADECIMIENTO

A Dios por haberme dado salud y la fuerza mental para terminar mi carrera universitaria con éxito, además de brindarme el cobijo de un ángel que fue muy importante en mi vida para poder llegar a estas instancias, Mishell cuidándome a lo largo de mi camino y juntos poder vencer cualquier obstáculo.

A mis padres Cesar y Victoria por su apoyo incondicional y aliento constante al educarme a su manera ya que al ser padres a muy temprana edad supieron inculcarme valores que formaron un hombre responsable para así terminar uno de los mayores desafíos como es mi carrera universitaria.

A mi hermano Efraín por soportarme todos los defectos y errores que pude tener, compartiendo momentos amenos así llegando a ser parte importante de mi vida, brindando su aliento para no rendirme jamás.

A mi familia por su apoyo incondicional en especial a mis tías Cecilia, Martha que de una u otra forma supieron apoyarme en los peores y buenos momentos que vivimos y supimos afrontar como Familia.

A mis amigos de la ESPOCH siendo docentes, técnicos de laboratorio compañeros, llegaron a convertirse en una segunda familia.

A los Ingenieros de AqLab especialmente Ing. Armando Meléndrez por abrirme las puertas de su laboratorio brindándome el apoyo y paciencia al momento de realizar mi tema de investigación, sin dejar de lado a los Ing. Nelson, Guido, Nathy.

A mi tutora del trabajo de titulación Karina Paredes Páliz PhD de igual forma al miembro de tribunal Ing. Rafaela Pacurucu, por su paciencia y dedicación al momento de revisar el escrito del trabajo de titulación.

Edwin

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xiii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
Planteamiento del problema.....	1
<i>Enunciado del problema</i>	1
<i>Formulación (Incógnita)</i>	2
Justificación.....	2
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	5
Objetivo General.....	5
Objetivos Específicos.....	5
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO	6
1.1. Antecedentes	6
1.2. Bases teóricas	7
1.2.1. <i>Características del hidrocarburo</i>	7
1.2.1.1. <i>Composición química de los hidrocarburos en el petróleo</i>	8
1.2.2. <i>Hidrocarburos totales de petróleo (TPHs)</i>	2
1.2.3. <i>El proceso de contaminación del petróleo en el suelo</i>	3
1.2.4. <i>Pasivos ambientales</i>	4
1.2.5. <i>Tipos de tratamientos</i>	5
1.2.6. <i>Microorganismos (m.o.)</i>	5
1.2.6.1. <i>Morfología y clasificación de las bacterias</i>	5
1.2.6.2. <i>Los microorganismos en el suelo</i>	7
1.2.6.3. <i>Microorganismos usados en biorremediación</i>	8
1.2.7. <i>Pseudomonas</i>	8
1.2.7.1. <i>Hábitat de Pseudomonas sp.</i>	10

1.2.7.2.	<i>Características de Pseudomonas sp.</i>	10
1.2.7.3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.3.	Bases Conceptuales	13
1.3.1.	Biorremediación	13
1.3.1.1.	<i>Bioestimulación</i>	14
1.3.1.2.	<i>Bioaumentación</i>	14
1.3.2.	Biodegradación de hidrocarburos	15
1.3.2.1.	<i>Biodegradación por bacterias</i>	16
1.3.3.	Biorremediación de TPHs.	17
1.3.3.1.	<i>Ventajas y limitaciones</i>	17
1.3.4.	Fundamentos teóricos de los parámetros a analizar	17
1.3.4.1.	<i>Materia Orgánica</i>	18
1.3.4.2.	<i>Humedad</i>	19
1.3.4.3.	<i>Temperatura</i>	20
1.4.	Base Legal	22
1.4.1.	Características químicas del suelo	23

CAPÍTULO II

2.	METODOLOGÍA	24
2.1.	Tipo de investigación	24
2.2.	Diseño de la investigación	24
2.2.1.	<i>Diseño experimental</i>	24
2.2.2.	<i>Identificación de variable</i>	25
2.2.3.	<i>Localización del estudio</i>	26
2.2.4.	<i>Población de estudio</i>	26
2.2.5.	<i>Tamaño de la muestra</i>	26
2.2.6.	<i>Método de muestreo</i>	27
2.2.7.	<i>Técnicas de recolección de datos</i>	27
2.2.8.	<i>Modelo estadístico</i>	27
2.3.	Procedimiento de la investigación	28
2.3.1.	<i>Construcción del invernadero</i>	28
2.3.2.	<i>Muestreo de suelo para el análisis</i>	28
2.3.3.	<i>Esterilización del suelo para los tratamientos</i>	29
2.3.4.	<i>Análisis físico-químicos de las muestras de suelo</i>	30
2.3.5.	<i>Medios de cultivo usados en la investigación</i>	32
2.3.6.	<i>Aislamiento de bacterias</i>	32

2.3.7.	<i>Verificación en placa de bacterias presentes en el suelo.</i>	33
2.3.8.	<i>Aislamiento de la Pseudomonas sp.</i>	33
2.3.9.	<i>Activación de la bacteria Pseudomonas aeruginosa</i>	34
2.3.10.	<i>Reactivación y masificación de las cepas de Pseudomonas sp.</i>	35
2.3.11.	<i>Estabilización de las colonias</i>	35
2.4.	Eficiencia	36
2.5.	Planteamiento de hipótesis	36
2.5.1.	<i>Hipótesis textual</i>	36
2.5.2.	<i>Hipótesis estadísticas</i>	36
2.5.2.1.	<i>Hipótesis nula</i>	36
2.5.2.2.	<i>Hipótesis alternativa</i>	37

CAPÍTULO III

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
3.1.	Análisis de resultados	38
3.1.1.	<i>Evaluación de las características físicas, químicas del suelo.</i>	38
3.2.	Evaluación del tratamiento	39
3.2.1.	<i>Evaluación de los TPHs durante el tratamiento</i>	40
3.2.2.	<i>Análisis de la conductividad eléctrica durante el tratamiento</i>	43
3.2.3.	<i>Análisis del pH durante el tratamiento</i>	44
3.2.4.	<i>Análisis de la temperatura durante el tratamiento</i>	45
3.2.5.	<i>Análisis de la humedad durante el tratamiento</i>	47
3.3.	Características biológicas	48
3.3.1.	<i>La caracterización morfológica de las Pseudomonas sp.</i>	48
3.3.2.	<i>Caracterización de Pseudomonas aeruginosa</i>	49
3.3.3.	<i>Control de la presencia de Pseudomonas</i>	50
3.4.	Eficiencia	55
3.5.	Comprobación de hipótesis	56
3.5.1.	<i>Pruebas de estadísticos descriptivos</i>	56
3.5.2.	<i>Normalidad</i>	58
3.5.3.	<i>ANOVA análisis de varianza</i>	61
	CONCLUSIONES	62
	RECOMENDACIONES	63
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Clasificación de los hidrocarburos del petróleo	11
Tabla 2-1: Taxonomía de la bacteria <i>Pseudomonas</i> sp.	18
Tabla 3-1: Ventajas y limitaciones de la biorremediación de suelos contaminados con TPHs....	25
Tabla 4-1: Sistemas que utilizan los microorganismos para degradar los hidrocarburos.	26
Tabla 5-1: Parámetros edáficos evaluados y sus métodos de análisis.	28
Tabla 6-1: Clasificación de la materia orgánica total.	29
Tabla 7-1: Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicios..	33
Tabla 1-2: Identificación de variables respuesta y de control dentro de la investigación.	36
Tabla 2-2: Diseño completamente al azar (DCA)	38
Tabla 3-2: Tiempo de control para las condiciones físico-químicas-microbiológicas.....	42
Tabla 4-2: Pesos para medio de cultivo bacteriano	44
Tabla 1-3: Parámetros físicos - químicos analizados en la investigación.....	51
Tabla 2-3: Comparación de los resultados de TPHs durante el tratamiento.....	53
Tabla 3-3: Parámetros analizados de la conductividad eléctrica durante el tratamiento.....	56
Tabla 4-3: Promedio de parámetros analizados del pH durante el tratamiento.....	57
Tabla 5-3: Resultados del parámetro temperatura promedio semanal durante el tratamiento.....	58
Tabla 6-3: Resultados de los parámetros de humedad semanal durante el tratamiento.....	60
Tabla 7-3: Control del tratamiento de la <i>P. aeruginosa</i> (S1), <i>Pseudomonas</i> sp (S2) presentes en suelo estéril y <i>Pseudomonas</i> presentes en el suelo patrón no estéril (S3).....	64
Tabla 8-3: Criterios estadísticos para toma de decisión.....	70
Tabla 9-3: Datos estadísticos descriptivos del análisis de TPHs biodegrado.....	71
Tabla 10-3: Datos estadísticos de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk.....	72
Tabla 11-3: Datos estadísticos del análisis de varianza ANOVA.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Estructura química de los principales hidrocarburos.....	10
Figura 2-1: Clasificación de las bacterias según su flagelo.	14
Figura 3-1: Flagelo polar de la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
Figura 4-1: Bacterias fluorescentes. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en agar sangre, bajo una luz ultravioleta.....	21
Figura 5-1: (a) <i>P. aeruginosa</i> en plate count agar (PCA); (b) <i>Pseudomonas</i> sp. en difco™ <i>Pseudomonas</i> isolation agar (DPI); (c) Blanco del medio de cultivo.....	21
Figura 6-1: Los poros entre partículas sólidas pueden estar ocupados por aire o agua.	30
Figura 1-2: Localización de la población de estudio de la investigación.	37
Figura 2-2: Construcción del invernadero.....	39
Figura 3-2: Muestreo en rejillas simple.....	40
Figura 4-2: Medios de cultivo Plate Count Agar (PCA), Difco™ <i>Pseudomonas</i> Isolation Agar (DPI), Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI)	43
Figura 1-3: Cubetos con 2 kg de suelo cada uno, tratado con la <i>P. aeruginosa</i> denominado suelo nativo estéril (S1) y sus réplicas (a, b, c, d).....	52
Figura 2-3: Cubetos con 2 kg de suelo cada uno, tratado con la <i>Pseudomonas</i> sp denominado suelo nativo estéril (S2) y sus réplicas (a, b, c, d).....	52
Figura 3-3: (a) <i>Pseudomonas</i> sp por 24 horas incubada a 35° C a partir de la dilución 10 ⁻¹ , (b) Morfología de la bacteria.....	61
Figura 4-3: Aislamiento de una colonia de <i>Pseudomonas</i> sp. (a) 48 horas de incubación a 35° C (b-c) 72 horas de incubación a 35° C.....	62
Figura 5-3: Aislamiento y desplazamiento de una colonia de <i>Pseudomonas</i> sp a los 7 días de incubación a 35° C.....	62
Figura 6-3: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> incubada a 35° C por 24 horas.....	63
Figura 7-3: Control de presencia de la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Pseudomonas</i> sp del suelo estéril a los 20 días.....	65
Figura 8-3: Presencia de <i>Pseudomonas</i> sp (S2) en los cubetos a los 40 días de tratamiento.....	66
Figura 9-3: Presencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (S1) en los cubetos a los 40 días de tratamiento.....	66
Figura 10-3: Presencia de las bacterias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Pseudomonas</i> sp del suelo nativo estéril a los 60 días de tratamiento.....	67
Figura 11-3: (a) Caldo BHI esterilizado <i>Pseudomonas</i> sp y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; (b) Masificación de la bacteria comercial y autóctona para la bioaumentación.....	67
Figura 12-3: Control de la presencia bacteriana en los cubetos S1 (a, b, c, d), S2 (a, b, c, d) a	

los 80 días incubada a 35° C por 24 horas.....	68
Figura 13-3: Disminución de la carga microbianapara la disposición final de <i>Pseudomonas</i> a los cubetos S1, S2 a los 80 días incubada a 35° C por 24 horas.....	68

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Biodegradación de TPHs promedio en función del tiempo durante los 80 días de tratamiento con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (S1).....	54
Gráfico 2-3: Biodegradación de TPHs promedio en función del tiempo durante los 80 días de tratamiento con <i>Pseudomonas sp</i> (S2).. ..	54
Gráfico 3-3: Biodegradación de los TPHs de la muestra patrón no estéril en 100 días de tratamiento con <i>Pseudomonas sp</i> (S3).....	55
Gráfico 4-3: Carta control semanal de la conductividad eléctrica del suelo tratado con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vs <i>Pseudomonas sp</i> en el S1, S2, S3.....	56
Gráfico 5-3: Carta control del pH en 80 días de tratamiento en el suelo estéril con <i>P. aeruginosa</i> (S1), <i>Pseudomonas sp</i> (S2); y suelo no estéril <i>Pseudomonas sp</i> (S3).....	57
Gráfico 6-3: Carta control promedio semanal de temperatura durante el tratamiento.....	60
Gráfico 7-3: Porcentaje de humedad durante los 80 días de tratamiento.....	60
Gráfico 8-3: Crecimiento de eficiencia al degradar TPHs de las bacterias <i>P. aeruginosa</i> (S1) y <i>Pseudomonas sp</i> (S2) en suelo nativo estéril durante los 80 días de tratamiento..	69
Gráfico 9-3: Crecimiento de eficiencia al degradar TPHs de la bacteria <i>Pseudomonas sp</i> en suelo nativo no estéril durante los 100 días de tratamiento.....	70
Gráfico 10-3: Q-Q normales TPHs 20 días para la bacteria autóctona y comercial.....	74
Gráfico 11-3: Q-Q normales TPHs 40 días para la bacteria autóctona y comercial.....	74
Gráfico 12-3: Q-Q normales TPHs 60 días para la bacteria autóctona y comercial.....	75
Gráfico 13-3: Q-Q normales TPHs 80 días para la bacteria autóctona y comercial.....	75

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-1: Procesos de la contaminación del petróleo en el suelo.	12
Ilustración 2-1: Clasificación de las bacterias por su necesidad específica.	15
Ilustración 3-1: Pirámide De Kelsen Para La Base Legal.....	32
Ilustración 1-2: Ubicación de las Áreas donde se desarrollará la infestación.	39
Ilustración 2-2: Procedimiento De Esterilización Del Suelo.	41
Ilustración 3-2: Procedimiento físico químicos de la investigación.	42
Ilustración 4-2: Procedimiento para siembra de <i>Pseudomonas</i> sp.	45
Ilustración 5-2: Procedimiento de MediLab para activar la <i>Pseudomona aeruginosa</i>	46
Ilustración 6-2: Procedimiento para reactivar y masificar de las cepas de <i>Pseudomonas</i> sp.....	46
Ilustración 7-2: Procedimiento para estabilizar las colonias.	47

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: PASTA

ANEXO B: PORTADA

ANEXO C: DERECHOS DE AUTOR (COPYRIGHT)

ANEXO D: DATOS DE LAS VARIABLES CONTROLADAS DURANTE LOS 80 DÍAS DE TRATAMIENTO DEL SUELO

ANEXO E: TEMPERATURA DIARIA DURANTE LOS 80 DÍAS DE TRATAMIENTO DEL SUELO

ANEXO F: AVAL DE LA INVESTIGACIÓN DIRIGIDO DE AQLAB DE ESPOCH.

ANEXO G: RECIBIDO DE OFICIO PARA LA INVESTIGACIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

ANEXO H: CERTIFICADO DE ACREDITACIÓN DEL LABORATORIO AQLAB

ANEXO I: CERTIFICADO DE LA CEPA *Pseudomonas aureginosa*

ANEXO J: CERTIFICADO DE CONTROL DE CALIDAD DE LOS ANÁLISIS FÍSICO, QUÍMICO, BIOLÓGICOS DE AQLAB

ANEXO K: MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANO

ANEXO L: CONSTRUCCIÓN DEL INVERNADERO

ANEXO M: MUESTREO DEL SUELO

ANEXO N: ANÁLISIS INICIALES DE PH Y CE DEL SUELO

ANEXO O: ANÁLISIS DE TPHS INICIAL DEL SUELO CONTAMINADO

ANEXO P: ANÁLISIS DE TPHS INICIAL DEL SUELO CONTAMINADO

ANEXO Q: DETERMINACIÓN DE SUSTANCIA SECA PARA TPHS

ANEXO R: AISLAMIENTO A DE *Pseudomonas* sp

ANEXO S: AISLAMIENTO B DE *Pseudomonas* sp

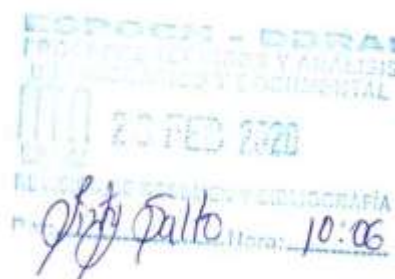
ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AOCA	Association of Official Analytical Chemist
APHA	American Public Health Association
AqLab	Laboratorio de Análisis Químico y Protección Ambiental
ATSDR	Agencia de Sustancias Tóxicas y el registro de enfermedades
AWWA	American Water Works Association
BHI	Caldo Infusión Cerebro Corazón
COt	Carbono Orgánico Total
CE	Conductividad Eléctrica
DPI	Difco™ <i>Pseudomonas</i> Isolation Agar
EPA	Environmental Protection Agency
MediLab	Laboratorio de Análisis Clínico y Bacteriológico
m.o.	Microorganismos
Nt	Nitrógeno Total
P	Fosforo
PCA	Agar Para Métodos Estándar Placa de 90 mm
pH	Potencial Hidrogeno
S1	Suelo Nativo Estéril Inoculado con <i>P. aeruginosa</i>
S2	Suelo Nativo Estéril Inoculado con <i>Pseudomonas</i> sp
S3	Suelo Nativo No Estéril Inoculado con <i>Pseudomonas</i> sp
T°	Temperatura
TPHs	Hidrocarburo Total de Petróleo
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
WEF	World Economic Forum

RESUMEN

El objetivo del presentetrabajo ha sido la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo (TPHs) de los pasivos ambientales del laboratorio AqLab en Prt. Francisco de Orellana, aplicando la técnica de bioaumentación con *Pseudomonas* sp (autóctona) y *Pseudomonas aeruginosa* (comercial). Se trabajó con dos tratamientos a partir de suelo esterilizado: uno inoculado con la cepa autóctona, y otro inoculado con la cepa comercial, realizando la medición del pH, conductividad eléctrica, materia orgánica, carbono orgánico total, nitrógeno, fósforo y la degradación de TPHs, cada 20 días por un período total de 80 días; para el tercer tratamiento se empleó suelo no esterilizado e inoculado con la bacteria autóctona y se monitoreó durante 100 días. La bacteria autóctona fue aislada a partir de los aglomerados del laboratorio en un medio de cultivo selectivo para *Pseudomonas* sp., mientras que la activación de la bacteria comercial se realizó siguiendo las especificaciones del laboratorio proveedor. Los tratamientos uno y dos logró la reducción del nivel de los TPHs fue del 84 % en promedio al cabo de 80 días, es decir, de aproximadamente 10000 mg/Kg de TPHs en la muestra inicial, se consiguió 1500 mg/Kg de TPHs al final del tratamiento. El tercer tratamiento logró una reducción del 96% del nivel de TPHs, pasando de más de 20000 mg/Kg de TPHs a aproximadamente 1000mg/Kg de TPHs al final del monitoreo, cumpliendo así con los límites permisibles de la normativa legal en Ecuador. Los resultados evidencian que la cepa autóctona aislada directamente de los aglomerados demostró una biodegradación más eficiente, sugiriendo trabajar con cepas nativas por presentar mejor adaptabilidad al medio contaminado, lo que aseguraría procesos de biorremediación más rápidos, eficientes, amigables con el ambiente y a menores costos.

Palabras clave: <BIOAUMENTACIÓN>, <BIODEGRADACIÓN>, <HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (TPHs)>, <SANEAMIENTO AMBIENTAL>.



ABSTRACT

The objective of the present work has been the biodegradation of Total Petroleum Hydrocarbons (TPHs) of the environmental liabilities of the AqLab laboratory in Prt. Francisco de Orellana, applying the bioaugmentation technique with *Pseudomonas sp* (native) and *Pseudomonas aeruginosa* (commercial). We worked with two treatments from sterilized soil: one inoculated with native strain, and another inoculated with commercial strain, measuring pH, electrical conductivity, organic matter, total organic carbon, nitrogen, phosphorus, and the degradation of TPHs every 20 days for a total period of 80 days; for the third treatment, non-sterilized soil inoculated with the native bacteria was used and monitored for 100 days; the native bacterium was isolated from the laboratory agglomerates in a selective culture medium for *Pseudomonas sp*, while the activation of the commercial bacteria was carried out following the specifications of the supplier laboratory. Treatments one and two achieved an 84% reduction of the TPHs level on average after 80 days, it is, approximately 10 000 mg/Kg of TPHs in the initial sample, 1500 mg/Kg of TPHs was achieved at end of treatment, the third treatment achieved a 96% reduction in the TPHs level from more than 20000 mg/Kg of TPHs to approximately 1 000mg/Kg of TPHs at the end of the monitoring, thus fulfilling the permissible limits of legal regulations in Ecuador. The results show that the autochthonous strain isolated directly from the agglomerates showed more efficient biodegradation, suggesting to work with native strains to present better adaptability to the contaminated environment, which would guarantee faster, efficient, and environmentally friendly bioremediation processes at lower costs.

Keywords: <BIOAUGMENTATION>, <BIODEGRADATION>, < TOTAL PETROLEUM HYDROCARBONS (TPHs) >, < ENVIRONMENTAL SANITATION >



INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

Enunciado del problema

El principal ingreso económico del Ecuador en las últimas décadas ha sido la actividad extractiva de crudo, principalmente en la región amazónica, donde hay recursos fósiles en gran cantidad (Becerra, et al., 2013).

La provincia de Orellana es considerada como una de las más importantes provincias del país que alojan a varias empresas petroleras nacionales e internacionales; concretamente el Puerto Francisco de Orellana, conocido como el Coca, es uno de los puntos clave donde se alojan los principales centros de operación de las empresas dedicadas a las actividades extractivas del crudo en todas sus fases, lo que ocasiona que su ecosistema sea altamente propenso a procesos de contaminación por derrames o remanencia del crudo (Alcaldía de Orellana, 2019).

Es por lo que en la actualidad uno de los principales problemas ambientales es la contaminación del suelo, agua y aire ocasionada por la explotación, transporte y almacenamiento del crudo; además de sus derivados como el combustible, grasas y aceites (Juteau, 2012).

Datos obtenidos por el Ministerio del Ambiente muestran que en Ecuador se producen incidentes menores por derrames de petróleo comparados con otros países petroleros, sin embargo, la descarga del crudo por parte de empresas privadas y públicas ha aumentado considerablemente la concentración de este en aguas y sedimentos. Estos derrames son mayormente atribuidos al mal manejo de equipos y maquinarias, fallas técnicas, fallas geotectónicas y a actividades antropogénicas (El Comercio, 2018).

Los derrames de petróleo causan al país pérdidas económicas millonarias. En caso de ocurrir un incidente de derrame a pequeña o gran escala, la legislación ecuatoriana vigente, específicamente el Decreto Ejecutivo 1215 RAOHE, manifiesta que se deben tomar medidas inmediatas para remediar la zona, dándose un monitoreo constante de los equipos, maquinarias y oleoductos. En este sentido, existen varias alternativas que pueden utilizarse para mitigar el efecto nocivo de los derrames petroleros.

Una de ellas es la biorremediación, que es considerada como una técnica biológica de bajo coste y amigable con el medio ambiente. Dentro de esta técnica, la bioaumentación permite la utilización

de microorganismos altamente especializados para incrementar y mejorar la capacidad de biodegradación de la población microbiana natural (Amerex, 2019).

Según la plataforma virtual Dspace de universidades del Ecuador hasta el 2019, varios países del mundo actualmente están aplicando la bioaumentación mediante el uso de microorganismos especializados para eliminar contaminantes específicos como son los hidrocarburos totales de petróleo (TPHs). En el caso de la bacteria *Pseudomonas sp.*, existen varios estudios que señalan el importante uso de este microorganismo en procesos de biorremediación debido al alto índice de eficacia en la biodegradación de TPHs.

El laboratorio de análisis químico y protección ambiental (AQLAB) ubicado en el Coca, lleva a cargo trabajos de biorremediación y almacenamiento de pasivos ambientales. Además, realizan monitoreos constantes de diversas parroquias y ciudades aledañas a la provincia que han sufrido diferentes tipos de contaminación tanto por crudo pesado, crudo liviano o cualquiera de sus derivados. Su objetivo principal es la preservación y cuidado ambiental por medio del empleo de técnicas biológicas que reduzcan el impacto ambiental, costos y tiempos de remediación que estos pasivos ambientales puedan llegar a tener sin tratamiento alguno, según lo estipulado en 2015 en el Acuerdo Ministerial 061 Reforma del Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria.

La presente investigación está enfocada a realizar el tratamiento de los pasivos ambientales anteriormente mencionados mediante el uso de microorganismos autóctonos, concretamente con la bacteria del género *Pseudomonas sp.*

Formulación (Incógnita)

¿Existe una cepa bacteriana autóctona capaz de resistir y degradar los hidrocarburos totales de petróleo mediante la bioaumentación?

¿Cuál es la eficiencia de la bacteria comercial *Pseudomonas aeruginosa* versus la bacteria autóctona aislada de zonas contaminadas por hidrocarburos totales de petróleo en términos de biodegradación de estos?

Justificación

Los combustibles fósiles son recursos limitados que se utilizan para la obtención de energía. Dentro de estos podemos encontrar al petróleo, carbón, gas natural y gas licuado del petróleo, mismos que se han formado a partir de la acumulación de grandes cantidades de restos orgánicos provenientes de plantas y de animales.

El uso de combustibles fósiles provoca contaminación atmosférica, gases generadores del efecto invernadero, lluvia ácida y enfermedades respiratorias (Herndon, y otros, 2019)

La actividad hidrocarburífera del Ecuador es uno de los principales motores que mueve la economía del país y por ello es imposible parar o sustituir el uso de este tipo de recursos. Dicha actividad emana al medio ambiente grandes cantidades de contaminantes que amenazan la calidad de aguas y suelos. Es por esto en los últimos años nace la necesidad de buscar soluciones a dichos problemas específicos para cada contaminante ya sea en suelo, aire o agua.

Gracias a la biotecnología se ha desarrollado diversas metodologías que permiten restaurar el suelo, agua e incluso el aire, de acuerdo con las necesidades y dimensiones del problema (Gurrola, 2008).

Una de las técnicas usadas hoy en día para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos es la biorremediación, en la cual se usan bacterias para la biodegradación efectiva de hidrocarburos totales de petróleo (TPHs). Hoy en día, gracias a los avances biológicos y tecnológicos, es mucho más fácil recurrir a cualquiera de los procesos de biorremediación como fitorremediación, bioestimulación, bioaugmentación, entre otros; donde usan organismos vivos para tratar estos contaminantes yendo desde microorganismos hasta plantas (Alexander, 1994).

En este contexto, la bioaugmentación surge por la necesidad de disminuir el impacto ambiental de un área afectada o contaminada por la presencia de hidrocarburos con el fin de detoxificar contaminantes en los diferentes ambientes (suelos y aguas) por medio del uso estratégico de microorganismos, plantas o enzimas (Arora, et al., 2015). Este mecanismo involucra la introducción artificial de poblaciones viables mediante la bioacumulación utilizando células vivas y la biosorción mediante biomasa microbiana muerta.

Por otro lado, la bioestimulación permite la activación de la población microbiana nativa; estas técnicas se caracterizan por ser tecnologías de remediación promisorias desde el punto de vista económico y de efectividad (Rajendran, et al., 2003).

Dentro de los grupos bacterianos mayormente usados con propósito de biorremediación, podemos mencionar al género *Pseudomonas sp.* considerado como uno de los grupos más heterogéneos y ecológicamente importantes de las bacterias degradadoras de hidrocarburos (Uğur, et al., 2012; Agrawal, T., 2015; Kumar, et al., 2015). Además, se ha encontrado bacterias que exhiben actividades de control biológico y biorremediación como las correspondientes a los géneros *Klebsiella sp.*, *Chromobacterium sp.*, *Flavimonas sp.*, *Enterobacter sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Burkholderia sp.*, *Sphingomonas sp.* y *Bacillus sp.* Cuyas cepas evaluadas tienen potencial enzimático para degradar hidrocarburos (Narváez, et al., 2008).

Los primeros estudios acerca de este microorganismo datan de finales de los 50s, cuando Leadbetter y Foster (1959) observaron que *Pseudomonas methanica* oxidaba el etano, pero no podía ocuparlo como fuente de carbono. Este fue el primero de una serie de artículos del grupo de Foster, quienes subsecuentemente observaron que esta bacteria, al crecer en un medio con metano, podía transformar diferentes hidrocarburos (García-Rivero, et al., 2008).. Además, en la actualidad la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los microorganismos más usados y estudiados en biorremediación y presenta una serie de actividades naturales sobre xenobióticos. Lamentablemente, también es conocida por ser un patógeno oportunista en humanos y causante de complicaciones graves en personas inmunosuprimidas, con quemaduras severas o con fibrosis quística (Rockne, et al., 2000).

Mediante el aislamiento selectivo bacteriano, se llevará a cabo experimentos a nivel de laboratorio con la finalidad de poder aplicarlo en el campo para evaluar la biodegradación de los TPHs en suelos, gracias a las cepas bacterianas aisladas, no sin antes ajustar las condiciones ambientales óptimas para el crecimiento bacteriano (Echeverri, et al., 2011). Dichos estudios fueron realizados en las instalaciones del laboratorio AqLab, ubicado en la ciudad del Coca, provincia de Orellana.

La presente investigación trata de reforzar la capacidad biorremediadora de *Pseudomonas sp.* con el objetivo de proponer soluciones económicas y eficientes para tratar suelos contaminados con crudo en derrames de todo el país, promoviendo así el interés de empresas especializadas en biorremediación y a su vez fomentando el interés del estudio de todas las especies de *Pseudomonas sp.* como degradadores de compuestos hidrocarbúricos.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General

- Analizar el efecto de la bioaumentación con bacterias autóctonas frente a *Pseudomonas aeruginosa* comercial en suelos contaminados con hidrocarburos totales de petróleo.

Objetivos Específicos

- Determinar las condiciones físico-químicas del suelo contaminado antes, durante y después del tratamiento.
- Aislar cepas de bacterias autóctonas degradadoras de hidrocarburos totales de petróleo presente en suelos de aglomerados de AqLab.
- Evaluar la capacidad de biodegradación de las cepas bacterianas escogidas frente a hidrocarburos totales de petróleo.
- Comparar la eficiencia de la bacteria autóctona frente a la bacteria comercial *Pseudomonas aeruginosa*.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

En el pasado, el desarrollo incontrolado de las actividades petroleras causó grandes impactos ambientales, sanitarios y sociales en todo el país. En particular, la actividad de la compañía petrolera Texaco, que operó en Ecuador entre 1964 y 1992, habría derramado en la naturaleza una cantidad de petróleo que supera en un 50% a los 10,8 millones de galones correspondientes al derrame del Exxon Valdez en las costas de Alaska en 1989, cuya limpieza costó más de 7.000 millones de dólares (Almeida, et al., 2008).

Desde el punto de vista social, se ha mostrado también los numerosos impactos de la actividad petrolera en la región amazónica (Jochnick, 1994; Maldonado, et al., 2003; Orta, et al., 2007; Beristain, et al., 2009) como: pérdidas culturales, destrucción no compensada de los recursos naturales utilizados cotidianamente por las poblaciones; violación de los derechos indígenas y de los territorios ancestrales; pérdida de cohesión social; pérdida de productividad de la tierra y morbilidad elevada de los animales, que en conjunto han puesto en peligro los sistemas locales de subsistencia (Bustamante, et al., 2007).

Desde un punto de vista histórico y a escala de la provincia amazónica, el dinero del petróleo sirvió en un momento dado para mejorar las condiciones sociales y económicas de vida de la población, pero su aporte se redujo rápidamente. Además, se estima que en las dos provincias petroleras (Sucumbíos y Orellana) hay un porcentaje mayor de pobreza que en el promedio nacional, pero no son los más pobres del país (Bustamante, et al., 2007).

Por otro lado, una contaminación ambiental continua y permanente, a pesar de tener un bajo impacto a corto plazo, puede tener consecuencias sanitarias importantes a largo plazo. En Ecuador, a pesar de las posibles consecuencias sanitarias (San_Sebastian, et al., 2001; Hurtig, 2004) los efectos sobre las poblaciones locales expuestas a productos petroleros, en particular, a hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y a hidrocarburos totales de petróleo (TPHs), no han sido descritos precisamente, ni han sido realmente puestos en el agenda política del gobierno (Bissardon, et al., 2013).

Por ello se llevan empleando medidas biocorrectoras en la descontaminación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos desde hace décadas con importante éxito. A mediados del siglo XX se desarrollaron las primeras investigaciones encaminadas a estudiar el potencial de los

microorganismos para biodegradar contaminantes (Cedillo, 2013). Este “uso” intencionado recibió entonces el nombre de biorremediación.

De esa fecha en adelante es uno de los principales métodos para biorremediar contaminantes específicos en períodos de tiempos muy cortos; las primeras técnicas que se aplicaron fueron similares a la labranza y sus actores las compañías petrolíferas. Durante los años 90 el desarrollo de las técnicas de burbujeo de oxígeno hizo posible la biorremediación en zonas por debajo del nivel freático. Paralelamente se desarrollaron métodos de ingeniería que mejoraron los rendimientos de las técnicas más populares para suelos contaminados (Roberts, 1998).

Dentro de este marco, el Laboratorio de Análisis y Evaluación Ambiental, (AqLab) enmarca sus actividades dentro de un Sistema de Gestión de Calidad afín a los requisitos de la Norma NTE INEN ISO/IEC 17025:2018, y en este accionar proporciona servicios de análisis de aguas, suelos, lixiviados y alimentos, con autonomía e integridad, para garantizar la calidad y confiabilidad de sus resultados. Además, promueve temas investigativos con respecto al cuidado ambiental y sanitario tanto en biorremediación como en validación de métodos para contribuir con el desarrollo de nuevos tratamientos para la protección ambiental.

1.2. Bases teóricas

1.2.1. Características del hidrocarburo

Según Montoya, et al. en el 2002 menciona que el petróleo es esencialmente una mezcla compleja de hidrocarburos de naturaleza química que se distinguen por poseer temperaturas de ebullición distintas. Estos se pueden clasificar en cuatro tipos de generales:

Parafinas o Alcanos: La serie parafínicas de los hidrocarburos se caracteriza por la regla de los átomos de carbono se hallan unidos mediante enlaces sencillos y otros están saturados con átomos de hidrogeno;(Montoya, et al., 2002).

Naftenos: Se denomina naftenos a los hidrocarburos cicloparafínicos en los que todos los enlaces disponibles de átomos de carbono están saturados con hidrógeno, hay muchos tipos de naftenos presentes en el crudo de petróleo; pero excepto para los compuestos de peso molecular más bajo, no se trata generalmente como compuestos individuales (Montoya, et al., 2002).

Aromáticos: Esta serie, a diferencia de las anteriores, son química y físicamente diferentes ya que estas contienen un anillo bencénico que no está saturado (Montoya, et al., 2002).

Olefinas: Esta serie se forma durante el proceso de deshidrogenación de parafinas y naftenos (Montoya, et al., 2002).

Dependiendo de la fuente, los hidrocarburos pueden ser numerosos. Además, el número de los componentes individuales en los diferentes tipos de petróleo es muy grande, lo que crea enormes retos al analista químico para su identificación y caracterización. Por ello hay otro tipo de clasificación según sus compuestos saturados de átomos de carbono e hidrogeno; de cadena lineal (alcanos), compuestos acíclicos (cicloalcanos) y compuestos aromáticos conteniendo cuando menos un anillo bencénico + en su estructura molecular (**Figura 1-1**).

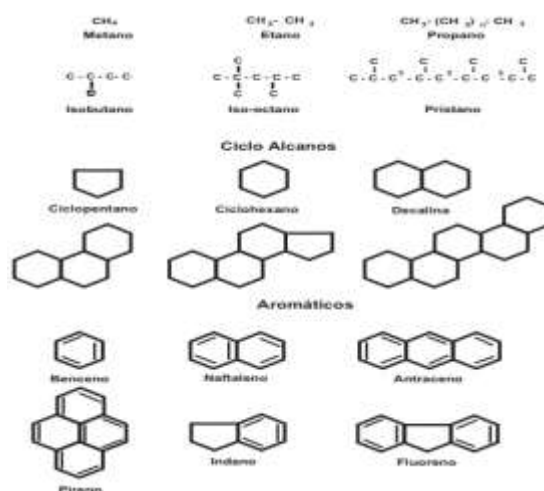


Figura 1-1: Estructura química de los principales hidrocarburos.

Fuente:(Botello, et al., 2005).

1.2.1.1. Composición química de los Hidrocarburos en el petróleo

Los principales componentes del petróleo son los hidrocarburos (compuestos químicos que contienen únicamente hidrógeno y carbono), los cuales representan el 50-98% en relación a la composición total(Clark, et al., 1977).

Dependiendo del método usado para la determinación de Hidrocarburos Totales del Petróleo (TPHs), algunos de los compuestos que contienen oxígeno, nitrógeno y azufre pueden ser incluidos en la cuantificación de TPHs, aunque por definición, estos compuestos no son hidrocarburos. Dada la complejidad del sistema puede resultar muy difícil identificar todos los componentes del petróleo y sus derivados (Posthuma, 1977), explicados con mayor detalle en la **Tabla 1.1**.

Tabla 1-1. Clasificación de los hidrocarburos del petróleo.

Tipo deHidrocarburo	Nombre	Fórmula general
Hidrocarburos saturados	Alifáticos / Alcanos	C_nH_{2n+2}
	Alicíclicos / Cicloalcanos	C_nH_{2n}
Hidrocarburos Insaturados	Alquenos / Olefinas	$C_nH_{2n} (C=C)$
	Alquinos / Acetilenos	$C_nH_{2n- 2} (C\equiv C)$
Aromáticos	Benceno	C_6H_6 (anillo aromático)
	Alquilbenceno	$C_6H_6-C_nH_{2n}$

		C ₆ H ₆ -C _n H _{2n-2}
Hidrocarburos Aromáticos		Dos o más anillos
Policíclicos	(PAHs)	aromáticos unidos entre si

Fuente:(Clarek & Brown, 1977).

Realizado por: Edwin Licita, 2019

La gran mayoría de estos compuestos cíclicos contienen una serie de constituyentes de importancia menor y que, a semejanza de los isoprenoides, también están formados por precursores específicos ya sea de plantas o animales (Posthuma, 1977). Además, son empleados como “marcadores moleculares” de gran uso e importancia en estudios geoquímicos y del comportamiento de derrames (Albaigés, et al., 1979).

1.2.2. *Hidrocarburos totales de petróleo (TPHs)*

Los términos hidrocarburos totales de petróleo (abreviados TPHs en inglés) se usan para describir una gran familia de varios cientos de compuestos químicos originados de petróleo crudo. El petróleo crudo es usado para manufacturar productos de petróleo, los cuales pueden contaminar severamente el ambiente (ATSDR, 1998). Debido a que hay muchos productos químicos diferentes en el petróleo crudo y en otros productos de petróleo, no es práctico medir cada uno en forma separada. Sin embargo, es útil medir la cantidad total de TPHs en un sitio.

Los TPHs son una mezcla de productos químicos compuestos principalmente de hidrógeno y carbono, llamados hidrocarburos. Los científicos han dividido a los TPHs en grupos de hidrocarburos de petróleo que se comportan en forma similar en el suelo o el agua. Estos grupos se llaman fracciones de hidrocarburos de petróleo. Cada fracción contiene muchos productos químicos individuales. Algunas sustancias químicas que pueden encontrarse en los TPHs incluyen a hexano, combustibles de aviones de reacción, aceites minerales, benceno, tolueno, xilenos, naftalina, y fluoreno, como también otros productos de petróleo y componentes de gasolina. Sin embargo, es probable que muestras de TPHs contengan solamente algunas, o una mezcla de estas sustancias químicas (ATSDR, 1998).

Como estrategias para la remediación, se han diseñado diferentes procesos para la remoción de compuestos contaminados con TPHs, como: métodos físicos (adsorción por carbono activado), químicos (extracción con solventes, oxidación química) y biológicos (utilizando microorganismos aerobios y/o anaerobios) (Agudelo, et al., 2001; Shan, 2002). En la estrategia de bioremediación, se pueden utilizar diferentes técnicas por separado o en combinación para lograr una mayor eficiencia de remoción del contaminante, como son:

- Destrucción y modificación del hidrocarburo: en este tipo de tecnologías se busca alterar la estructura química del contaminante.
- Extracción o separación: los contaminantes se extraen y se separan del medio contaminado, en base a sus propiedades físicas o químicas como lo es la volatilización, solubilidad, carga eléctrica, entre otros.
- Aislamiento e inmovilización: en este caso se trata de estabilizar o solidificar los contaminantes por métodos físicos o químicos.

1.2.3. El proceso de contaminación del petróleo en el suelo

Los procesos importantes en caso de un derrame son los detallados en la **Ilustración1-1**.

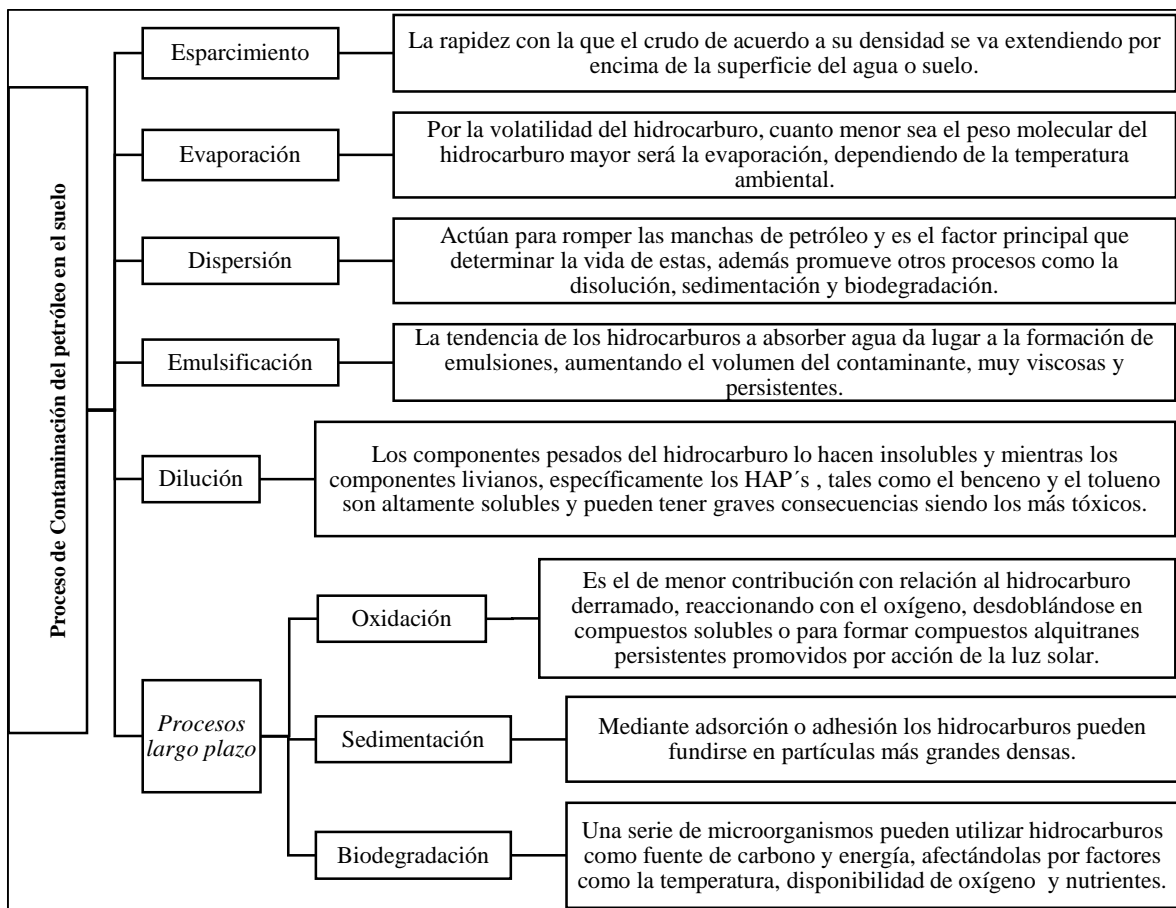


Ilustración 1-1: Procesos de la contaminación del petróleo en el suelo.

Fuente:(Montoya, et al., 2002).

Realizado por: Edwin Licita, 2019

1.2.4. Pasivos ambientales

Se entiende por pasivo ambiental la suma de los daños no compensados producidos por una empresa al medio ambiente a lo largo de su historia, en su actividad normal o en caso de accidente (Martinez, et al., 2013).

El término "pasivos ambientales" surge en empresas nacionales como en el caso de Petroecuador que, en 1996, se consideraban a estos pasivos como un costo o daño ambiental que afecta directamente a la rentabilidad socioeconómica del área afectada. En el caso de empresas que se dedican a tratar este tipo de contaminantes, como es el caso de Ecuambiente, se enfocan en tres pilares fundamentales denominados: capital natural, humano, y social.

Los encargados de la protección ambiental en función de la economía del área afectada hablan de los daños ambientales como 'externalidades', es decir como lesiones al medioambiente producidas por un fracaso del mercado, que hace que no sea el responsable del daño el que pague la reparación o compensación, sino la sociedad en su conjunto. En realidad, se podría decir que dichas deudas son éxitos de traslación de los costos a la sociedad, que permiten a las empresas ser competitivas(O'Connor, 1996; Martinez, et al., 2013).

Al considerar los pasivos ambientales, surgen dos temas de análisis: la evaluación monetaria y la responsabilidad jurídica. En cuanto al primero, ¿cómo determinar el impacto de una actividad contaminante en un contexto complejo y de fuerte incertidumbre? Y, puesto que se trata en la mayoría de los casos de bienes no intercambiables en el mercado, ¿cómo valorar los daños ambientales? En primer lugar, la evaluación de los pasivos ambientales se enfrenta a problemas de inconmensurabilidad de valores, es decir, la imposibilidad de representar en un solo lenguaje, en este caso el lenguaje monetario, los daños producidos en esferas diferentes de la actividad humana (Munda, et al., 1998; Martinez, et al., 2013).

Además, muchas veces los daños ambientales producidos y sus consecuencias a largo plazo no son fácilmente cuantificables debido a la interacción con los ecosistemas y con la sociedad humana (Chavas, 2000; EEA, 2001). En segundo lugar, ¿qué incluir en la evaluación del pasivo ambiental? Se podría decir que una estimación completa tendría que incluir: el costo de reparación del daño; el valor de la producción perdida a causa de la contaminación, es decir, la riqueza no producida; una compensación por los daños irreversibles (Chavas, 2000).

Cuando una empresa causa un daño a la colectividad, la responsabilidad moral es clara, pero ¿de quién es la responsabilidad jurídica? ¿Quién tiene que hacerse cargo del costo de saneamiento de los lugares contaminados y de la compensación de los daños, cuando se puede? ¿Y quién tiene que pagar a las víctimas cuando los daños son irreversibles: la sociedad en su conjunto o el causante de

la contaminación? ¿El pasivo ambiental es una responsabilidad pública o privada? (Martinez, et al., 2013).

El grado de responsabilidad jurídica del pasivo ambiental al que las empresas están sujetas depende del sistema legislativo nacional donde el daño se produce. Muchas transnacionales occidentales prefieren operar en los países del Sur, no sólo porque allí están las materias primas sino también porque las normas ambientales y laborales son menos estrictas, y esto permite ahorrar en los costos. Sin embargo, muchas veces el problema principal no es tanto la falta de legislación, sino de control (Martinez, et al., 2013).

1.2.5. Tipos de tratamientos

Los principales tipos de tratamientos usados a nivel mundial para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos totales de petróleo son los físico químicos, biológicos y térmicos.

- Tratamientos Térmicos: por medio de la acción del calor se logra la volatilización (separación), quema, descomposición o fusión (inmovilización) de los contaminantes en un suelo (Shan, 2002).
- Tratamientos Físico-químicos: en base a las propiedades físicas y químicas de los contaminantes o del medio contaminado, se separa y destruye el contaminante (Agudelo, et al., 2001).
- Tratamientos Biológicos (Biorremediación): esta metodología utiliza el metabolismo de diferentes microorganismos para utilizar diferentes hidrocarburos como única fuente de carbono y de energía, con el fin de degradar o transformar los contaminantes a productos metabólicos inocuos o de menor toxicidad (Haritash, et al., 2009).

1.2.6. Microorganismos(m.o.)

1.2.6.1. Morfología y clasificación de las bacterias

La nueva clasificación realizada por los investigadores Vargas M. y Alvin T. realizada en 2014 basada en la investigación de Ivañes-Pareja de 1998, donde se habla de la morfología de las bacterias según sus necesidades específicas como requerimiento de nutrientes y oxígeno, resistencia a temperatura, se explica con mayor detalle en la **Ilustración 2-1**. Según su flagelo estos pueden clasificarse en; a. atrícas, b. monótricas, c. anfítricas, d. lofótricas, e. perítricas como se detalla en la **Figura 2-1**.

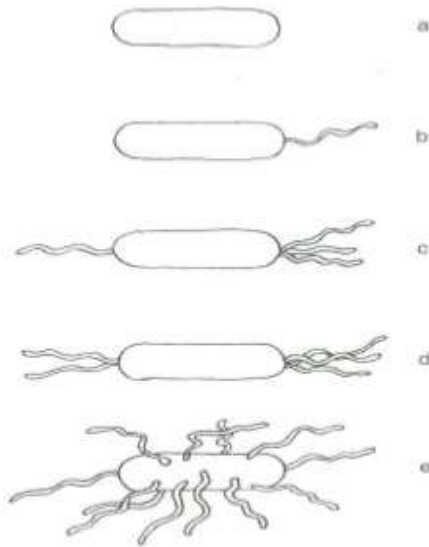


Figura 2-1. Clasificación de las bacterias según su flagelo.

Fuente:(Vargas, et al., 2014)

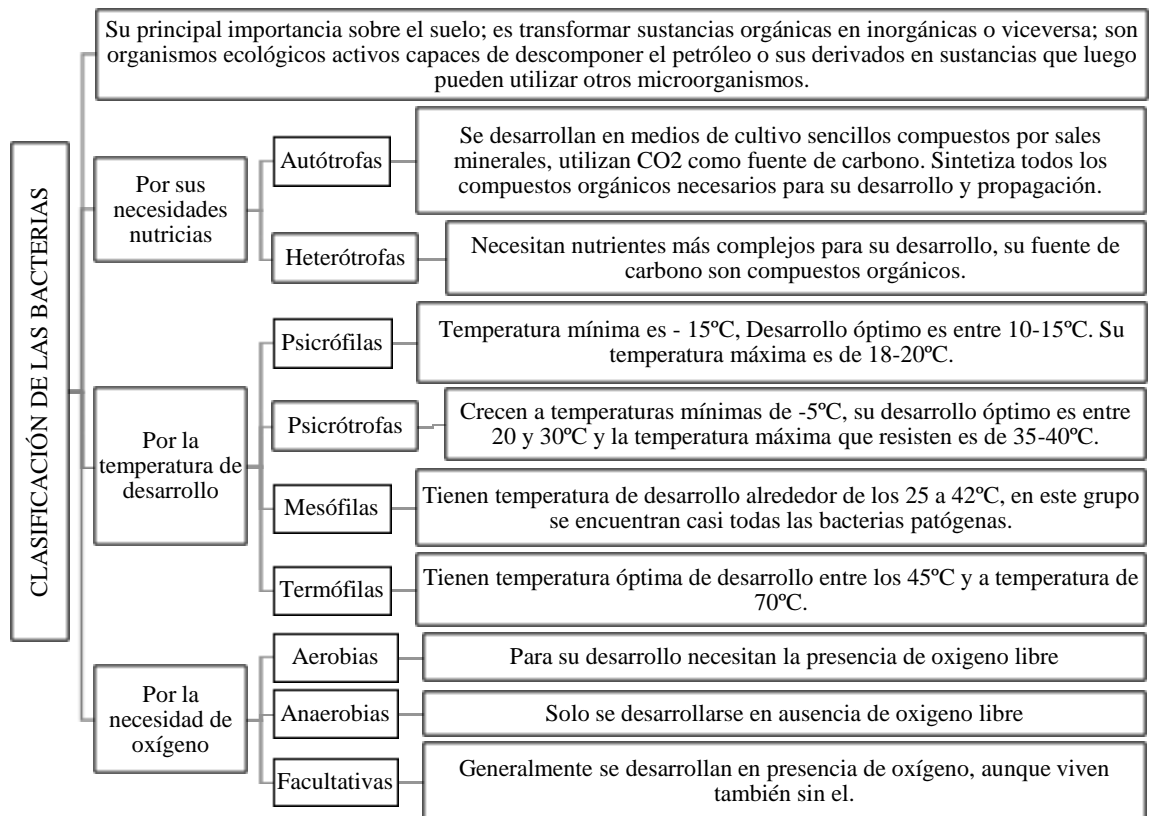


Ilustración 2-1: Clasificación de las bacterias por su necesidad específica.

Fuente:(Iañez-Pareja, 1998; Vargas, et al., 2014)

Realizado por: Edwin Licata, 2019

1.2.6.2. Los microorganismos en el suelo

El suelo es un hábitat favorable para la proliferación de microorganismos (m.o.) y en las partículas que lo forman se desarrollan microcolonias. Los microorganismos aislados del suelo comprenden virus, bacterias, hongos, algas y protozoos (Plaster, 2000). Las concentraciones de m.o. son relativamente altas en dichos ambientes, el cual favorece el desarrollo de microorganismos heterótrofos (Atlas, et al., 2001; Porta, et al., 2003; Tortora, 2007).

Las bacterias Gram negativas y los actinomicetes son incapaces de utilizar los compuestos húmicos; sin embargo, muestran una actividad intensa y un crecimiento rápido sobre sustratos fácilmente utilizables que están disponibles en forma de material vegetal, excrementos de animales y restos de animales muertos. Una actividad intermitente, con períodos inactivos de reposo, es una característica de los organismos zimógenos, como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Mucor* (Atlas, et al., 2001; Tortora, 2007).

Sin embargo, zimógeno no es sinónimo de autóctono, aunque solamente estén activos de manera intermitente, los organismos zimógenos son verdaderas formas autóctonas del suelo. Los suelos presentan muchos tipos de microhábitats y en una localización particular pueden darse diversas situaciones microambientales que podrían favorecer diferentes poblaciones autóctonas (Venkateswaran, et al., 1995; Sugiura, et al., 1997; Budzinski, et al., 1998).

Las bacterias del suelo pueden ser aerobias estrictas, anaerobias facultativas, microaerófilas o anaerobias estrictas. Determinados suelos pueden favorecer poblaciones bacterianas con un metabolismo particular. Entre los géneros más frecuentes de bacterias del suelo se encuentran *Acinobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Caulobacter*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Xanthomonas* (Atlas, et al., 2001; Tortora, 2007).

Las cianobacterias forman costras en la superficie de los suelos desnudos de vegetación y contribuyen así a la estabilización del suelo (Atlas, et al., 2001; Tortora, 2007).

Azotobacter es un importante heterótrofo de vida libre, que puede convertir el nitrógeno atmosférico en formas fijadas de nitrógeno. También especies anaerobias de *Clostridium* pueden fijar nitrógeno del suelo, *Rhizobium* y *Bradyrhizodium*, fijan nitrógeno atmosférico dentro de los nódulos de las raíces de determinadas plantas. Las especies de *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, suelen llegar al suelo junto con material vegetal infectado (Atlas, et al., 2001; Tortora, 2007).

1.2.6.3. *Microorganismos usados en biorremediación*

Hoy en día, a nivel mundial, se cuenta con diversas técnicas biológicas con el fin de proporcionar alternativas de descontaminación de zonas impactadas en suelo, aire y agua. La biorremediación es un proceso de descontaminación que emplea una serie de reacciones bioquímicas por una población o consorcios de microorganismos inoculados en la zona contaminada, para convertir la estructura de los hidrocarburos en componentes menos tóxicos (Benavides, et al., 2006).

La materia de la naturaleza se transforma mediante conversiones biológicas. Aunque todos los seres vivos contribuyen a la vida, los microorganismos desempeñan un papel destacado en los cambios geoquímicos y la fertilidad del suelo. Transforman una cantidad enorme de materia orgánica y solamente ellos pueden realizar ciertas transformaciones esenciales. Estos cambios se realizan en diversos ecosistemas de la biosfera. Muchas transformaciones tienen lugar en el suelo, otras en ambientes acuáticos o en la atmósfera (Plaster, 2000; Atlas, et al., 2001).

Los actinomicetes, bacterias Gram positivas aerobias que forman micelios ramificados, degradan los restos vegetales y animales, polímeros complejos e hidrocarburos y mantienen el suelo suelto y desmenuzado (Casellas, et al., 1998; Foght, et al., 1998; Komukai-Nakamura, et al., 1996). La disponibilidad de nutrientes y de oxígeno determina el número y los tipos de actinomicetes de un suelo. Otro grupo de organismos aerobios, los hongos, degradan la materia orgánica del suelo (de los compuestos simples a los polímeros complejos). Algunos hongos son depredadores de protozoos o nemátodos, limitando su población en el suelo. Otros son micoparásitos, atacan a otras especies de hongos (Atlas, et al., 2001).

Los microorganismos que biodegradan hidrocarburos del petróleo, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos incluyendo naftaleno, hidrocarburos aromáticos como tolueno, o hidrocarburos alifáticos como n-alcanos, son aislados del medio ambiente, particularmente de sitios contaminados con petróleo. Algunas de las rutas metabólicas microbianas responsables de la biodegradación, incluyendo las rutas ALK (C a 5C n-alcanos), NAH (naftaleno) y XYL (tolueno), han sido ampliamente caracterizadas; están generalmente relacionadas con plásmidos catabólicos encontrados en *Pseudomonas* sp., por ejemplos los plásmidos OCT, NAH y TOL. (Sayler, et al., 1990; Whyte, et al., 1997).

1.2.7. *Pseudomonas*

Pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* incluye al género *Xanthomonas*, que, junto con las *Pseudomonas*, forman el grupo conocido como Pseudomonadales; este grupo es tradicionalmente, conocido por los microbiólogos como un grupo patógeno de las plantas. (Migula, 1985). Se cree que

este género fue presentado por primera vez en 1985, Alemania, por Walter Migula en el *Instituto Bacteriológico de la Universidad Técnica de Karlsruhe* en una publicación que llevaba por título “Ueber ein neues System der Bakterien” (Migula, 1985). Por lo cual la taxonomía de las *Pseudomonas* es resumida según Palleroni por primera vez en 1992 detallada en la **Tabla 2-1**.

Tabla 2-1: Taxonomía de la bacteria *Pseudomonas sp.*

Orden	Familia	Género	Grupo según Homología ARNr	Especie
Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	I. Fluorescente	<i>P. aeruginosa</i>
				<i>P. fluorescens</i>
				<i>P. putida</i>
			II. No Fluorescente	<i>P. stutzeri</i>
				<i>P. mendocina</i>
				<i>P. alcaligenes</i>
				<i>P. pseudoalcaligenes</i>
				<i>P. pseudomallei</i>
				<i>P. mallei</i>
				<i>P. picketti</i>
			III. *Acidovorax, Comamonas	<i>A. delafieldii</i>
				<i>C. acidovorans</i>
				<i>C. testosteroni</i>
			IV. *	<i>P. diminuta</i>
				<i>P. versicularis</i>
V. Stenotrophomonas	<i>S. maltophilia</i>			

*El grupo de homolisis III y IV son especies aisladas con poca frecuencia en seres humanos.

Fuente:(Palleroni, 1992).

Realizado por: Edwin Licta, 2019

Dentro de *Pseudomonas sp.* más estudiadas tenemos a la *Pseudomonas aeruginosa* que es considerada como una de las especies más patógenas y con una alta adaptabilidad a condiciones extremas.

Pseudomonas es un género de especies capaces de utilizar un amplio rango de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos, y capaces de vivir bajo diversas condiciones ambientales. Debido a esta característica, estos microorganismos son muy ubicuos; es así que podemos encontrarlos en los ecosistemas terrestres y acuáticos (Palleroni, 1992; Schroth, et al., 1992).

Este género de *Pseudomonas sp.* es más conocido por su versatilidad metabólica y plasticidad genética. Las especies de *Pseudomonas*, en general, crecen rápidamente y presentan gran habilidad

para metabolizar una amplia variedad de sustratos, incluyendo compuestos orgánicos tóxicos, como hidrocarburos alifáticos y aromáticos (Palleroni, 1992). Las cepas de las especies de *Pseudomonas* son frecuentemente resistentes a antibióticos, desinfectantes, detergentes, metales pesados y solventes orgánicos.

La habilidad de diferenciar *Pseudomonas* en el sentido estricto, de las bacterias fenotípicamente similares se debe, principalmente, al desarrollo y aplicación de métodos de análisis de los microorganismos a nivel molecular, por ejemplo se han utilizado métodos de comparación de secuencias del 16S ARNr o hibridación de ADN-ARNr, así el género de *Pseudomonas* se limita a las especies relacionada con *P. aeruginosa* en el grupo I de homología ADN-ARNr (De Vos, et al., 1989; Palleroni, et al., 1973), dentro de la subclase y de las Proteobacterias, actualmente reorganizado como la clase de las “Gammaproteobacterias” (Woese, et al., 1985; Brenner, et al., 2001).

1.2.7.1. Hábitat de *Pseudomonas* sp.

Pseudomonas sp es un género verdaderamente ubicuo, lo cual parece ser consecuencia de los simples requerimientos que posee, del rango de compuestos de carbón que utiliza, y de su gran adaptabilidad genética y metabólica (Palleroni, 1984).

La especie de *Pseudomonas* pueden vivir en numerosos hábitats, que van desde diversos tipos de ambientes acuáticos y terrestres, hasta tejidos de diversos animales y plantas, incluyendo frutas y verduras, por lo tanto, el hábitat primario es ambiental. Esencialmente, cualquier hábitat con rangos de temperatura de 4-42° C, un pH comprendido entre 4-8 y que contenga compuestos orgánicos simples o complejos, es un hábitat potencial para *Pseudomonas*, así pues, las especies de *Pseudomonas* se encuentran en suelos y aguas que presenten unas condiciones aeróbicas, mesofílicas y pH neutro (Palleroni, 1992).

Debido a que la mayoría de las especies de este género son aeróbicas estrictas, el oxígeno es aparentemente casi el único requerimiento obligado para la colonización de un ambiente por *Pseudomonas* (Palleroni, 1984).

1.2.7.2. Características de *Pseudomonas* sp.

Pseudomonas sp. es un bacilo Gram negativo aeróbico, no formador de esporas. Puede presentar de 1,5 a 5 µm de largo y un diámetro de 0,5 a 1 µm. La especie de este género son móviles, debido a la presencia de uno o más flagelos polares (**Figura 3-1**), generando movilidad permitiéndoles responder a estímulos químicos llamado quimiotaxis, y localizar sustratos en bajas concentraciones (Palleroni, 1992).

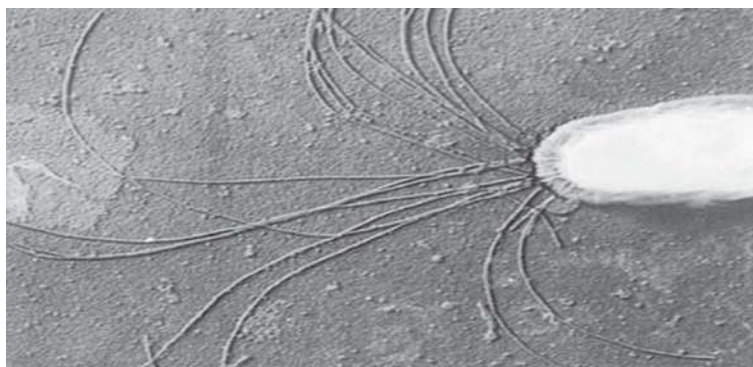


Figura3-1:Flagelo polar de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

Fuente:(Brooks, et al.)

Es oxidasa catalasa positiva, la mayoría de las especies del género crecen bajo condiciones ácidas, es decir con un pH menor igual a 4,5. Su metabolismo es aerobio estricto con el oxígeno como aceptor final de electrones. La mayoría de las *Pseudomonas* sp. tienen una temperatura óptima de crecimiento de 30 a 37 °C, pero pueden sobrevivir y multiplicarse en casi cualquier ambiente, en un rango de temperatura comprendido entre 20 a 42 °C, además en medios con elevado contenido de sales (Palleroni, 2005).

Cuando crecen en medios líquidos se puede observar la formación de películas superficiales, que refleja la presencia de este microorganismo a condiciones aeróbicas. Pueden degradar la glucosa oxidativamente y convertir el nitrógeno en nitrito o nitrógeno gas y algunas especies utilizan carbohidratos, alcoholes y aminoácidos como fuente de carbón (Palleroni, 2005).

Tienen la capacidad de producir morfología coloniales distintivas y pigmentadas, algunas cepas forman una cápsula de polisacárido que hace que las colonias sean mucosas clínicamente hablando; el crecimiento es confluyente y a menudo presenta un brillo metálico y olor a fruta. Una característica común de la bacteria "*Pseudomonas fluorescens*" es la producción de pigmentos fluorescentes bajo la luz ultravioleta de longitud de onda baja (254 nm), sobre todo cuando crecen en un medio con limitación de hierro (**Figura4-1**).

La pioverdina, un pigmento fluorescente de color amarillo verdoso está considerado el principal tipo de sideróforo de las especies de *Pseudomonas*.



Figura 4-1. Bacterias fluorescentes. *Pseudomonas aeruginosa* en agar sangre, bajo una luz ultravioleta.

Fuente:(Bacterio Lógico, 2016)

Otros pigmentos producidos por otras especies del género son la piocianina, pigmento no fluorescente de color azul-verdoso producido por la mayoría de las cepas *P. aeruginosa*, piorubina; pigmentación color rojo similar al óxido; oxiclolorafina pigmento color naranja en especies de *P. Aurefaciens*, *P. chlororaphis*; y la clororafina pigmentación color verde en especies de *P. chlororaphis*; entre muchas otras pigmentaciones.

Muchos de estos pigmentos actúan como sideróforos en los sistemas bacterianos de captación de hierro (Meyer, et al., 2002). La producción de pigmentos puede demostrarse cultivando estos microorganismos en el medio como el medio de King B, que no contiene hierro. Ese medio está también recomendado para demostrar la producción de piocianina. Las cepas no pigmentadas presentan un color gris pálido, cuando crecen en agar presentan hemólisis (**Figura 5-1**).

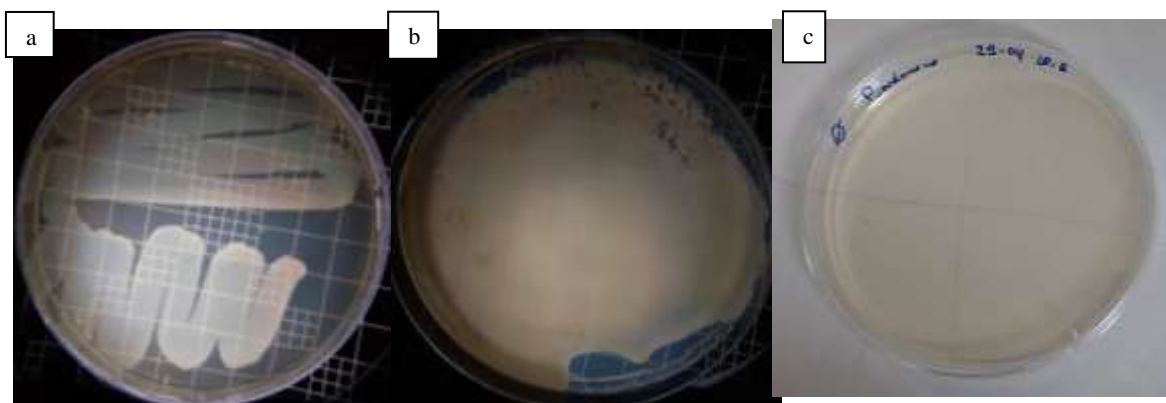


Figura 5-1. (a) Colonias de *P. aeruginosa* incubadas en Plate Count Agar (PCA); (b) *Pseudomonas* sp. En Difco™ Pseudomonas Insolation Agar (DPI); (c) Blanco del medio de cultivo.

Realizado por: Edwin Licta, 2019

1.2.7.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Fue aislada por primera vez en muestras ambientales por Schrocter en 1872, debido a que las colonias de *P. aeruginosa* son pigmentadas, la denominación de la especie deriva de la palabra aeruginoso(*aeruginous*)que significa “el color del cobre oxidado”, reflejando el color característico color azul verdoso que presentan las colonias debido a la producción de pigmentos (Palleroni, 1984).

Como todos los miembros de esta familia es un bacilo Gram negativo aerobio, muy versátil metabólicamente, pudiendo utilizar más de 80compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía. Es oxidasa positiva y pueden crecer en temperaturas superiores a 42° C. aunque se clasifica como aerobio estricto, algunas cepas pueden crecer anaeróbicamente mediante desnitrificación o mediante la fermentación de compuestos como la arginina o el piruvato.

Debido a su habilidad para sobrevivir en ambientes acuosos con nutrientes mínimos, y como consecuencia de su gran velocidad metabólica, estos organismos, han llegado a ser un problema en áreas como la salud clínica, siendo la especie mayormente aislada en soluciones acuosas, incluyendo desinfectantes, jabones, fluidos de irrigación y de diálisis, (Morrison, et al., 1984) otras fuentes halladas son en piscinas, tubos de agua caliente, soluciones de lentes de contacto, cosméticos, uñas artificiales, suelas interiores de zapatillas de deporte, y en drogas inyectables (Fisher, et al., 1985; Holland, et al., 1993; Pollack, 2000).

1.3. Bases Conceptuales

1.3.1. Biorremediación

La biorremediación es una tecnología aplicada en la limpieza de contaminantes en el suelo, agua y aire, por ser una técnica de fácil construcción, operación y mantenimiento. Es aplicable a grandes extensiones de tierra, conlleva un bajo costo y puede completar la remoción del contaminante en poco tiempo (Huesemann, 1994).

Los procesos de biorremediación pueden ser divididos básicamente en tres clases: primero, en atenuación natural, donde la concentración de contaminantes es reducida por los microorganismos nativos del suelo; segundo, la bioestimulación, donde se adicionan nutrientes y un aceptor de electrones al sistema para mejorar su efectividad y acelerar la biodegradación y finalmente la bioaugmentación, en donde se inocula el sistema con uno o varios microorganismos apropiados (Salinas, et al., 2007).

1.3.1.1. *Bioestimulación*

Implica la circulación de soluciones acuosas (que contengan nutrientes y/u oxígeno) a través del suelo o aguas contaminadas, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos, y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos o bien, la inmovilización de contaminantes inorgánicos *in situ* (Van Deuren, et al., 2002).

La atenuación natural es un método de remediación pasiva que depende de los procesos naturales para degradar y disminuir los contaminantes en el suelo y el agua subterránea (Kao, et al., 2001). Los resultados de la atenuación natural dependen de la presencia o ausencia de los microorganismos degradadores adecuados, oxígeno disuelto, el nivel de nutrientes y de la biodisponibilidad de los contaminantes (Menéndez, et al., 2007).

1.3.1.2. *Bioaumentación*

La bioaumentación se refiere al uso de cepas microbianas que han sido estudiadas en el laboratorio para tratar con mayor rapidez y eficacia suelos y aguas contaminadas. El proceso se inicia a menudo en el propio medio contaminado, donde se toman muestras microbianas (Sabaté, et al., 2004).

Es un proceso natural que se basa en la utilización de bacterias, hongos y plantas para eliminar los contaminantes, ya que estos organismos son capaces de utilizar los contaminantes orgánicos como fuente de energía en sus procesos metabólicos, haciendo que los contaminantes se conviertan en productos inocuos o menos tóxicos en la mayoría de los casos (Sabaté, et al., 2004). A los sistemas de tratamiento que se interviene se adicionan microorganismos especializados con el fin de mejorar la calidad de la biomasa.

1.3.1.2.1. *Aplicaciones de la bioaumentación*

Se ha usado la bioaumentación para biorremediación de suelos contaminados al ser aplicada efectivamente para el tratamiento de diversos factores antropogénicos que alteran las condiciones naturales del suelo.

En investigaciones de Alexander M. en 1994 se menciona que se solucionan problemas puntuales como:

- Baja remoción de contaminantes (DBO, DQO, SST, etc.)
- Choques orgánicos que pueden desestabilizar la PTAR.
- Acumulación de depósitos de grasas y desechos biodegradables.

- Generación de malos olores durante el tratamiento del agua.
- Proliferación de bacterias filamentosas en reactores biológicos.

1.3.2. Biodegradación de hidrocarburos

Los hidrocarburos del petróleo son productos naturales que se originan por la transformación anaeróbica de la biomasa en condiciones de temperatura y presión elevadas (Echeverri, et al., 2011).

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos alifáticos, alicíclicos y aromáticos; también contiene una menor proporción de compuestos que no son hidrocarburos como: ácidos nafténicos, fenoles, tioles, compuestos heterocíclicos de nitrógeno, compuestos de azufre y metaloporfirinas. Además, cada tipo de crudo tiene varios cientos de componentes diferentes. Por todo ello hay que tener en cuenta que se necesitan muchas vías catabólicas diferentes para su biodegradación y por lo tanto, muchas poblaciones diferentes de microorganismos que puedan utilizar estos compuestos como fuente de energía y carbono (Echeverri, et al., 2011).

A continuación, en la **Tabla 4-1** se contempla de manera breve y general los sistemas que utilizan los microorganismos para degradar los diferentes tipos de hidrocarburos.

Tabla 4-1: Sistemas que utilizan los microorganismos para degradar los Hidrocarburos.

Biodegradación de hidrocarburos alifáticos en presencia de oxígeno.	Los hidrocarburos alifáticos los podemos clasificar en alcanos, alquenos y alquilos dependiendo de lo saturados que estén sus enlaces. Como más insaturado sea una cadena carbonatada (más dobles y triples enlaces) más difícil o lenta será su biodegradación (Narváez, et al., 2008).
Biodegradación de hidrocarburos aromáticos en presencia de oxígeno.	Los microorganismos que utilizan estos compuestos aromáticos como fuente de carbono, lo que hacen es que en lugar de utilizar una enzima monooxigenasa específica para cada molécula diferente, mediante vías bioquímicas llamadas vías altas o periféricas que consisten en modificar los diferentes anillos aromáticos absorbidos en protocatechuate y catechol (Loera, et al., 2016).
Biodegradación anaeróbica.	El hecho que en todos los ambientes donde los hidrocarburos naturales se forman el oxígeno no está presente, ha hecho pensar a la comunidad científica que los hidrocarburos no podrían ser degradados anaeróbicamente. Pero a finales de 1980s se descubrieron algunos microorganismos que si tenían cierta actividad degradadora bajo condiciones estrictas (Gonzales, et al., 2014).

Realizado por: Edwin Licita, 2019.

1.3.2.1. Biodegradación por bacterias

La mayoría de los microorganismos capaces de degradar estos compuestos son aislados de suelos o sedimentos contaminados (Villatoro, et al., 2002). Existen microorganismos, entre ellos tres especies de *Pseudomonas* sp., conocidas por su habilidad de emplear compuestos aromáticos como única fuente de carbono y que son citados repetidamente en la literatura por poseer una notable capacidad de degradar gran cantidad de compuestos aromáticos en concentraciones considerables y en tiempos relativamente cortos (Alexieva, et al., 2008; Haritash, et al., 2009).

De igual manera, algunas especies de los géneros *Klebsiella* sp., *Chromobacterium* sp., *Flavimonas* sp., *Enterobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Burkholderia* sp., *Sphingomonas* sp. y *Bacillus* sp. entre otros, han mostrado la capacidad de degradar el BaP (Benzo (a) pirina), (considerado como cancerígeno y tóxico) cuando son crecidas con una fuente de carbono alternativa (Narváez, et al., 2008; Haritash, et al., 2009). Dicha biodegradación de aromáticos está directamente relacionada con la densidad microbiana y su incremento en la biomasa. Un estudio realizado por Haritash y Kaushik en el 2009, mostró que en un período de seis meses un consorcio mixto de *Acenitobacter* y *Klebsiella* redujo significativamente el total de hidrocarburos aromáticos policíclicos en un 98% aproximadamente (Villarreal, et al., 2014).

Las metalotioneinas (MT's) fueron descubiertas hace 45 años y juegan un rol central en el metabolismo de metales pesados y en el manejo de varias formas de estrés microbiano. Las MT's son proteínas de bajo peso molecular (6-7 KDa) ricas en cisteína, que se dividen en tres clases de acuerdo al contenido de cisteína y a su estructura; la primera clase son las que tienen dominios Cis-Cis, las segundas las que tienen dominios Cis-X-Cis y las terceras las que tienen dominios Cis-X-X-Cis en donde X corresponde a cualquier aminoácido. Estas proteínas han sido aisladas de especies bacterianas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida* y los géneros *Cyanobacterium* sp. y *Syneococcus* sp. (Rajendran, et al., 2003).

Muchos microorganismos producen y excretan sideróforos que son moléculas acomplejantes de hierro, muchas de las cuales tienen alta afinidad por los metales pesados, en *Pseudomonas aeruginosa* y *Alcaligenes eutrophus* la síntesis de sideróforos está inducida por metales pesados en presencia de altas concentraciones de hierro (Budzinski, et al., 1998).

Juwarkar et al, (2007) aplicaron biosurfactantes producidos por *Pseudomonas aeruginosa* para la remediación de suelos contaminados con Cd y Pb con buenos resultados.

1.3.3. Biorremediación deTPHs.

El término debiorremediación se utiliza para describir una amplia variedad de sistemas que utilizan el potencial metabólico de los organismos vivos (plantas, hongos y bacterias, entre otros) para limpiar ambientes contaminados (Watanabe, 2001; Van Deuren, et al., 2002).La biorremediación de un suelo implica su descontaminación por vía biológica. En el caso de sitios contaminados con TPHs, los microorganismos pueden modificar su movilidad en el ambiente a través de cambios en sus características físicas o químicas (Lovley, et al., 1997).

1.3.3.1. Ventajas y limitaciones

En general, el lavado del suelo es una alternativa relativamente económica para la remoción de contaminantes, ya que minimiza el volumen del material contaminado y, por consiguiente, disminuye la cantidad a confiar o tratar (**Tabla 3-1**). Actualmente, existen sistemas móviles para el lavado del suelo que se puede transportar al sitio contaminado, disminuyendo costos y el riesgo de dispersar los contaminantes durante el transporte (Van Deuren, et al., 2002).

Tabla 3-1: Ventajas y limitaciones de la biorremediación desuelos contaminados conTPHs.

VENTAJAS	LIMITACIONES
<ul style="list-style-type: none">• Bajos costos• Efectivo para tratar suelos arenosos o muy permeables• Disminuye la cantidad de material contaminado• Son sistemas cerrados, en donde se pueden controlar las condiciones del sistema y las emisiones al ambiente	<ul style="list-style-type: none">• Se requiere excavar y manipular el suelo• Altas cantidades de material orgánico dificultan en proceso de separación• No es eficiente paratratar mezclas complejas• Los contaminantes ser solubles• Requiere grandes cantidades de agua

Fuente:(Van Deuren, et al., 2002; USEPA, 2001)

Realizado por: Edwin Licta, 2019

1.3.4. Fundamentos teóricos de los parámetros a analizar

Los fundamentos teóricos aplicados mediante métodos analíticos para así analizar cada parámetro a ser controlado durante toda la investigación se los detalla en la **Tabla 5-1**.

Tabla 5-1: Parámetros edáficos evaluados y sus métodos de análisis

PARÁMETRO	MÉTODO ANALÍTICO	Referencias
Muestreo	Recolección y preservación de la muestra compuesta y representativa (homogeneización)	APHA/AWWA/WEF Standard Methods. N° 1060; DIN 38402 (serie A11-A22) Cap. 1. p. 38-46
Temperatura	Determinación directa con termómetro de mercurio (análogo) o digital; graduación 0.1° C. Alternativa: determinación con sensor de temperatura.	APHA/AWWA/WEF Standard Methods. N° 2550 B. Cap. 2 p. 74,
pH	Potenciómetro, Dilución 1:2 Determinación de pH 4500-H ⁺	EPA 9045 C; APHA/AWWA/WEF Standard Methods N° 4500- H ⁺ ;DIN 38406-E5 23rd edición. Cap. 4. p. 95.
Conductividad eléctrica, CE (dS/m)	Extracción de pasta de saturación Conductivímetro 1:5	EPA 9050 A; APHA/AWWA/WEF Standard Methods N° 2510 Análisis de conductividad. Cap. 2, p.56.
Carbono Orgánico, CO (mg/kg)	Método de Walkley and Black por combustión húmeda y calentamiento externo	EPA 9060; APHA/AWWA/WEF Standard Methods N°5310 Análisis Carbono Orgánico total. cap. 5 p. 23-26
Fosforo disponible	Destilación de la muestra y determinación de fosfato (PO ₄), fotometría o electrodo ionosensitivo	Booker Tropical Soil Manual; APHA/AWWA/WEF Standard Methods No. 4500-NH3; DIN 38406-E5
Retención de humedad (%)	Secado de muestra a 105° C hasta peso constante y determinación gravimétrica.	ASTM D3976-92
TPHs en Suelos	Método de Extracción con Hexano, remoción de sustancias polares en el extracto y determinación por espectroscopía infrarrojo.	ASTM D3921-96; DIN 38409-H18, EPA 3550C; 418.1; 1664. (SGT-HEM) Publication N° ECY 97-602 (Washington, 1997
<i>Pseudomonas sp</i>	Método en la verificación de la presencia de la especie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Standard Methods N°. 9213E AOCA, 2003, 07, 2005

Realizado por: Edwin Licta, 2019.

1.3.4.1. Materia Orgánica

La materia orgánica según la investigación de Brady (1984) toma a los suelos como producto de la descomposición química de las excreciones de animales y microorganismos, de residuos de plantas o de la biodegradación de cualquiera de ellos tras su muerte. En general, la materia orgánica se clasifica en compuestos húmicos y no húmicos. En los segundos persiste todavía la composición química e incluso la estructura física de los tejidos animales o vegetales originales. Los organismos

del suelo descomponen este tipo de sustancias orgánicas dejando solamente residuos difícilmente atacables, como algunos aceites, grasas, ceras y ligninas procedentes de las plantas superiores de origen. El resto son transformados por parte de los microorganismos, reteniendo una parte como componentes propios (polisacáridos, por ejemplo). El producto de tal transformación es una mezcla compleja de sustancias coloidales y amorfas de color negro o marrón oscuro denominado genéricamente humus (Brady, 1984). El humus constituye aproximadamente entre el 65 y el 75 % de la materia orgánica de los suelos minerales. Los suelos minerales son los de un contenido de materia orgánica menor del 20 %, ocupando el 95 % de la superficie terrestre mundial. Los suelos con un mayor contenido en materia orgánica se denominan suelos orgánicos. El contenido medio aproximado de materia orgánica en los suelos de labor oscila entre el 1 y el 6 %, explicados en la **Tabla 6-1**.

Tabla 6-1: Clasificación de la Materia Orgánica Total.

Clasificación	C Orgánico (%)	Sustancia Orgánica
Muy Alto	>6	>10
Alto	3,0-6,0	5,0-10,0
Medio	1,5-3,0	2,5-5,0
Bajo	0,6-1,5	1-1,5
Muy Bajo	<0,6	<1

Fuente: (Anderson, 1993).

La consecuencia radiométrica de mayor interés, debido al contenido en materia orgánica, es la pérdida de reflectancia del suelo en el espectro visible, que se manifiesta en un oscurecimiento característico de este tipo de suelos. Así, por ejemplo, los suelos desarrollados en condiciones de pradera semiárida suelen presentar altos contenido en materia orgánica, razón por la cual ofrecen una pigmentación muy oscura. En regiones templadas y húmedas la pigmentación es menos acusada y muy poco aparente en los suelos de las regiones tropicales y subtropicales (Brady, 1984)

1.3.4.2. Humedad

El suelo es un sistema natural que consta de una o más sustancias y de una mezcla de interacciones entre sus tres fases (Malagón, et al., 1990): fase sólida (las partículas del suelo), fase líquida (agua) y fase gaseosa (aire). La fase sólida puede ser mineral u orgánica; la mineral está compuesta por partículas de distintos tamaños, formas y composición química; la orgánica está compuesta por residuos vegetales en diferentes etapas de descomposición y organismos en estado de vida activa. La fase líquida está constituida por el agua en el suelo con sustancias en solución y ocupa una parte o la totalidad de los poros entre partículas sólidas. La fase gaseosa corresponde al vapor o aire que

ocupa aquel espacio entre poros no ocupado por el agua, así como se muestra en la **Figura6-1** (Zamora-Cardona, et al., 2008).

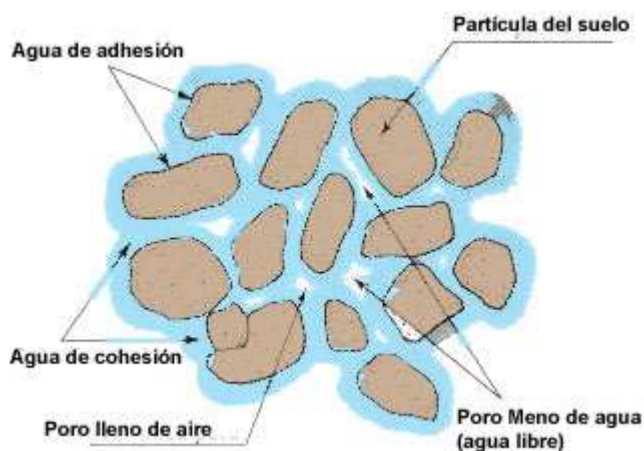


Figura6-1: Los poros entre partículas sólidas pueden estar ocupados por aire o agua.

Fuente: (Brady, 1984).

En la investigación de Don-Kirkham(1972), donde se habla del suelo, este está difícilmente en equilibrio ya que continuamente sufre alteraciones en sus propiedades físicas como: cambios mecánicos (expansión o contracción), movimiento de su fase líquida, transporte de solutos, variaciones térmicas, etc. Dichas alteraciones se deben principalmente al contenido de agua en el suelo (humedad). Conocer el contenido de humedad en el suelo y los efectos en sus propiedades físicas es de gran importancia para distintas líneas de investigación que abordan el tema (Zamora-Cardona, et al., 2008).

1.3.4.3. Temperatura

La temperatura del suelo es fácil de medir y los datos recogidos son muy útiles para los científicos. Tiene efectos sobre: el clima, el crecimiento de las plantas (al momento en que aparecen los brotes o se cae la hoja) en la velocidad de descomposición de los desechos orgánicos y a otros procesos químicos, físicos y biológicos que suceden en el suelo. Está asociada a la temperatura de la atmósfera porque el suelo es un aislante del flujo de calor entre la tierra sólida y la atmósfera(Trojer, 1966b). En un día soleado, por ejemplo, el suelo absorbe energía del sol y su temperatura aumenta. Por la noche, el suelo libera calor al aire, y esto afecta directamente a la temperatura del aire.

La temperatura del suelo afecta la selección de la fecha de siembra, el crecimiento de las plantas y los microorganismos y las propiedades del suelo a través de su grado de meteorización. En las zonas tropicales, las fluctuaciones estacionales de la temperatura del aire y del suelo son menores

que en la zona templada y las fluctuaciones diarias son de mayor magnitud que las estacionales. En el suelo, la penetración de las fluctuaciones diarias de temperatura alcanza hasta 20 a 30 cm de profundidad, las fluctuaciones mensuales hasta 2 m y las anuales hasta 10 m de profundidad (Trojer, 1966b; Allen, et al., 2000). El control de la temperatura del suelo puede darse seleccionando la zona ecológica, el manejo de la sombra, el tipo de cobertura, la profundidad de siembra, el riego y el drenaje.

Para definir los regímenes de temperatura del suelo, según la Sociedad de la Ciencia del Suelo de América (Soil Science Society of America), se mide esta variable a 50 cm de profundidad, ya que está fuera del alcance de las fluctuaciones diarias. A esta profundidad en las zonas tropicales, la diferencia de temperatura media del mes más caliente y la del mes más frío es de 5°C o menos y, según el piso altitudinal, puede considerarse isohipertérmica (temperatura media anual a 50 cm de profundidad mayor a 22°C), isotérmica (15-22°C), isomélica (8-15°C) o isofrígida (8°C).

1.4. Base Legal

Se considera la base legal actual para la aplicabilidad de la investigación según la pirámide de Kelsen detallada en la **Ilustración 3-1**.

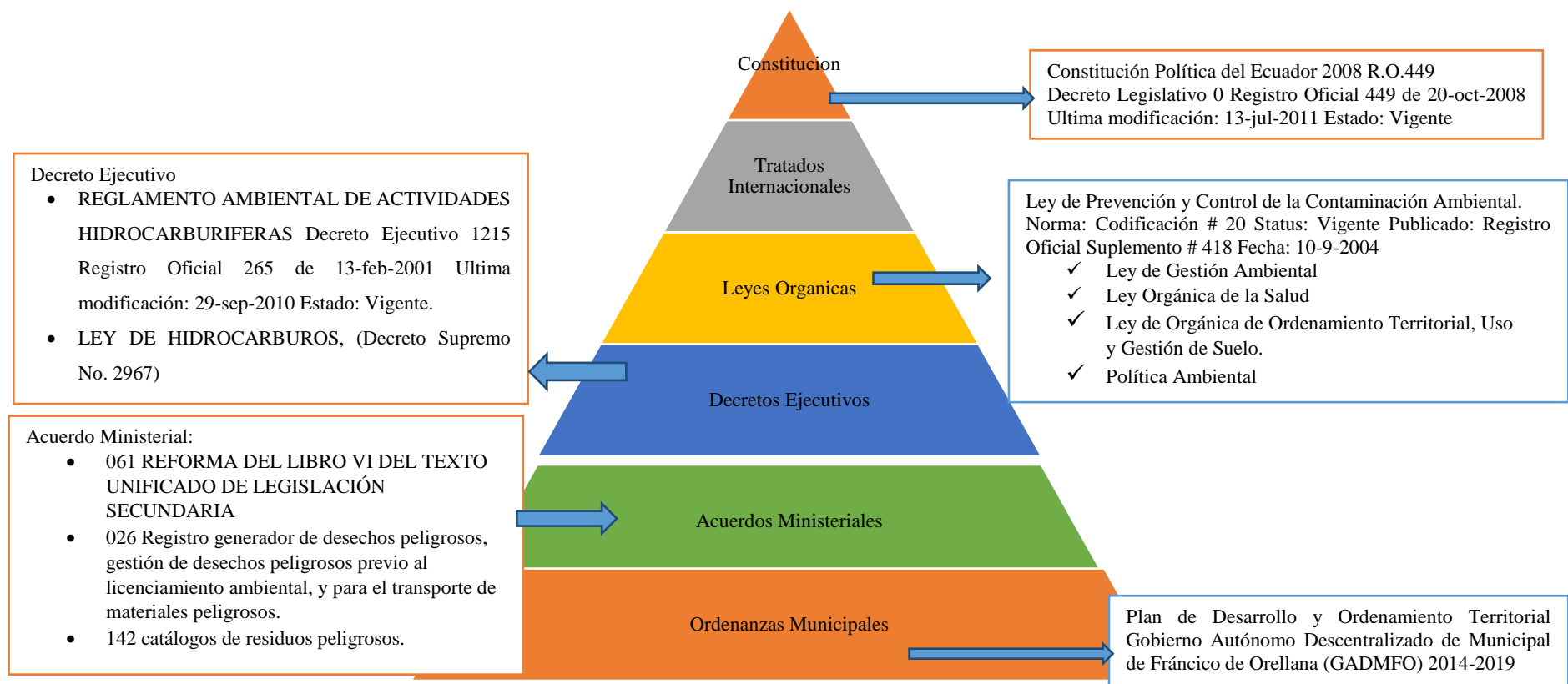


Ilustración 3-1. Pirámide de Kelsen para la base legal.

1.4.1. Características químicas del suelo

Para medir la eficiencia de biodegradación del TPHs se ha tomado como base el reglamento ambiental de actividades hidrocarburíferas, decreto ejecutivo 1215 registro oficial 265 de 13-feb-2001 última modificación: 29-sep-2010 estado: vigente, cuyos límites permisibles se encuentran en la **Tabla 7-1**. Además, se toma en cuenta la fertilidad del suelo ya que la fertilidad es la calidad que posee el suelo para proporcionar los nutrientes necesarios para el desarrollo normal y productivo de las plantas. Los niveles de fertilidad vienen dados de acuerdo con las características químicas del suelo:

- Potencial hidrógeno (pH)
- Conductividad Eléctrica Capacidad de Intercambio catiónico (CIC)
- Bases totales (BT)
- Saturación de bases (SB)
- Contenido de carbono orgánico (CCo)
- Nitrógeno rotante (NR)
- Fósforo (P)

Tabla 7-1: Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicios.

Parámetro	Expresado en	Unidad	Uso agrícola	Uso industrial	Ecosistemas sensibles
Hidrocarburos totales	TPHs	mg/kg	<2500	<4000	<1000
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)	C	mg/kg	<2	<5	<1
Cadmio	Cd	mg/kg	<2	<10	<1
Níquel	Ni	mg/kg	<50	<100	<40
Plomo	Pb	mg/kg	<100	<500	<80

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Tipo de investigación

Por el método de investigación mixta, según el objetivoteórica, según el nivel de profundización en el objeto de estudio exploratoria, según la manipulación de variables experimental, según el tipo de inferencia hipotética-deductiva, según el periodo temporal longitudinal (Hernández, et al., 2017).

2.2. Diseño de la investigación

En la bioaumentación se utilizó un método de investigación cualitativo y según la manipulación de variables se usó un diseño experimental.

2.2.1. *Diseño experimental*

Dentro del proceso de investigación y análisis de la bioaumentación para la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo presentes en los aglomerados de suelos en AqLab, donde se manipuló una variable y se controló las demás, con la finalidad de aceptar o rechazar las hipótesis planteadas. Siguiendo una serie de procesos resumidos en los siguientes puntos.

- La construcción del invernadero para la homogenización y acondicionar las muestras de suelo para su posterior análisis, dividiéndolo en cubetos para la bacteria autóctona y cubetos para la bacteria comercial realizando por triplicado es decir cada bacteria con 4 repeticiones, dando un total de cubetos durante los 80 días de tratamiento.
- El análisis inicial, promedio y final de las condiciones físico-químicas-microbiológicas (Temperatura, pH, Humedad, Conductividad Eléctrica, Materia Orgánica, Carbono Orgánico total, Nitrógeno, Fosforo, Unidades formadoras de Colonias) del suelo contaminado, así tener un control para el crecimiento microbiano. Y de ser necesario adicionar nutrientes (N:P:K) y se volteará manualmente (Oxígeno) como control biótico mediante tratamientos.
- El aislamiento de microorganismos autóctonos se realizó a partir de muestras de suelo de los pasivos ambientales encontrados en AqLab, por lo que se preparó el medio de cultivo (agar DPI) con las condiciones óptimas para el crecimiento de estas bacterias

degradadoras de TPHs, se realizará la caracterización de cepas bacteriana solo morfológicamente por su género mas no su especie.

- La activación de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* según la técnica del Laboratorio MEDIBAC proveedor integral para el laboratorio AqLab.
- Se comparó la capacidad de biodegradación de TPHs de la bacteria autóctona y la bacteria comercial para llevar un control estadístico al tomar datos antes durante y al finalizar el tratamiento.
- Se calculó del porcentaje de eficiencia de cada muestra experimental de la biodegradación de TPHs mediante espectrofotometría de infrarrojo, así mediante una regla de tres simple la cual consiste en multiplicar el último valor de concentración de TPHs por cien y dividir para el valor inicial de concentración de TPHs finalmente restarle del 100%, usando el método de comparación de dos poblaciones bacterianas y saber cuál fue más eficiente al degradar el TPHs.

2.2.2. Identificación de variable

Para la investigación se tomó en cuenta las variables para la bioaumentación según el tipo de investigación y su diseño (Tabla 1-2).

Tabla 1-2: Identificación de variables respuesta y de control dentro de la investigación.

Variables de Respuesta	Variables de Control	Intervinientes
<ul style="list-style-type: none"> • Hidrocarburos totales de petróleo degradado. • Tiempo 	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia de Microorganismos. • Aislamiento específico de microorganismo. • Características Físicoquímicas del suelo Temperatura, pH, Humedad, Conductividad Eléctrica, Materia Orgánica, Carbono Orgánico total, Nitrógeno, Fosforo). • Análisis de biodegradación mediante espectrofotometría Infrarrojo. • Eficiencia de una bacteria autóctona vs bacteria comercial (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>). 	<p>Crecimiento de Microorganismos (Cultivos) en medios en medio Plate Count Agar (PCA) y <i>Pseudomonas</i> sp En Difco™ <i>Pseudomonas</i> Insoaation Agar(DPI).</p> <p>Análisis Físico del suelo (Temperatura, pH, Humedad, Conductividad Eléctrica, Materia Orgánica, Carbono Orgánico total, Nitrógeno, Fosforo).</p> <p>UFC presentes después de la valoración de eficiencia.</p>

Realizado por: Edwin Licta, 2019

2.2.3. Localización del estudio

La presente investigación se la realizó en la provincia de Francisco de Orellana, El Coca, (**Figura 1-2**), en el laboratorio de análisis y evaluación ambiental (AqLab), con las coordenadas georreferenciales 279265 m E y 9948497 m S ubicados en la zona 18M, WGS-84 S – UTM, extraídas de Google Earth.

2.2.4. Población de estudio

La población de estudio corresponde a 230 kilogramos de suelo con la presencia de TPHs y los microorganismos degradadores de estos. Ubicados en las coordenadas 9948517 m S y 279266 m E de la zona 18M, WGS-84 S – UTM, extraídas con el GPS modelo Etrex 20 GRAIMN.

Trasladados al invernadero después de cuantificar la cantidad exacta de los pasivos ambientales a ser tratados ubicados en las coordenadas 279266 m E, 9948505 m S de la zona 18M, WGS-84 S – UTM, extraídas de Google Earth (**Figura 1-2**).



Figura 2-2. Localización de la población de estudio de la investigación.

Realizado por: Edwin Licta, 2019.

2.2.5. Tamaño de la muestra

Se calcula alrededor de un tanque de 50L lleno de aglomerados de suelo que tienen AqLab contaminada con hidrocarburo. Dando un valor total de 230 Kg de la cual se debe restar 16 kg usados para el tratamiento y verificación de la eficiencia de las bacterias degradadoras de TPHs.

2.2.6. Método de muestreo

En esta investigación no se realizó el muestreo a ninguna empresa externa de los suelos contaminados con TPHs ya que en laboratorio de AqLab tiene aglomerados de suelos denominados pasivos ambientales. Pero cabe recalcar que se realizó un muestreo en rejillas simples de 8 y 8 cm con un barreno que acupe toda la profundidad del tanque es decir 75 cm del total de la población de estudio para realizar las características físicas, química y el aislamiento de la bacteria autóctona por la biodegradación de los TPHs.

2.2.7. Técnicas de recolección de datos

La recolección de datos facilitó la selección de datos aleatorios muy importantes para la investigación ya que con estos se corrobora la información bibliográfica de varios temas de investigación similares a esta nueva investigación, aportando así con el conocimiento científico. Se realizó el seguimiento del proceso mediante análisis químico-físicos con la asistencia del laboratorio AqLab.

2.2.8. Modelo estadístico

Test paramétricos de comparación basados en el tamaño de la muestra, y el cumplimiento de los supuestos de normalidad, homogeneidad e independencia. Se emplea el diseño completamente al azar (DCA), que nos ayudó a saber si un tratamiento es distinto al otro tratamiento con lo respecta a las bacterias autóctonas vs la bacteria comercial, con 4 repeticiones, utilizando la prueba de TUKEY, es uno de los procesos estadísticos con un porcentaje de error menor al 5%.

Tabla 2-2: Diseño completamente al azar (DCA)

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	INOCULACIÓN	REPETICIONES
Suelo 1 (S1)	Suelo Nativo Estéril	Bacteria comercial (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	S1.a S1.b S1.c S1.d
Suelo 2 (S2)	Suelo Nativo Estéril	Bacteria autóctona aislada (<i>Pseudomonas</i> sp)	S2.a S2.b S2.c S2.d
Suelo 3 (S3)	Suelo Nativo No Estéril	Bacteria autóctona aislada (<i>Pseudomonas</i> sp)	No se realizaron repeticiones

Realizado por: Edwin Licta, 2019

2.3. Procedimiento de la investigación

2.3.1. Construcción del invernadero

Se procedió a la construcción del invernadero para la aceleración de la desecación de los pasivos ambientales acumulados en AqLab (**Ilustración 1.2**) y la homogenización de la muestra patrón para los análisis requeridos en la investigación, así también, como control de la temperatura del suelo.

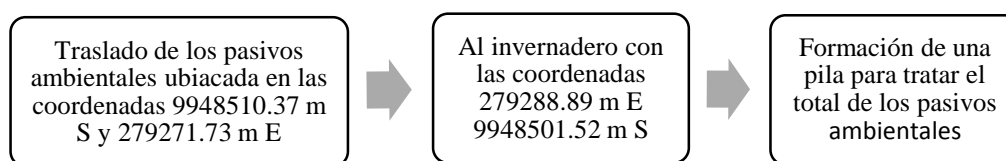


Ilustración 1-2. Ubicación de las áreas donde se desarrollará la homogenización del suelo.

Realizado por: Edwin Licta, 2019

Detalle de la construcción: se colocó las guadúas y madera como el exoesqueleto del invernadero para soportar las condiciones climáticas, así recubrirlo con el plástico, la geomembrana se usó para la impermeabilizar el suelo y proteger al suelo nativo del suelo contaminados con TPHs, con una altura de 50 cm sobre la altura del suelo (**Figura 2-2**).



Figura 2-2. Construcción del invernadero.

Realizado por: Edwin Licta, 2019.

2.3.2. Muestreo de suelo para el análisis

De los pasivos ambientales localizados en AqLab, en un tanque de 55 Gal con un diámetro interno de 55 cm y altura de 88 cm, se procedió a realizar el muestreo en rejillas

simpledividiéndolo en casillas de 5 x 5 cm dado un total de 18 puntos dentro de la circunferencia usando un barreno de 1 pulg de diámetro.

Se extrajo un total de 6 kg de suelo para su posterior análisis inicial(**Figura 3-2**) ya que a partir de estas muestras se realizó el análisis físico, químico y microbiológico durante todo el tratamiento. Es necesario el constante homogenización y oxigenación para así, este suelo este homogéneo a la hora del análisis de laboratorio.



Figura 3-2. Muestreo en rejillas simple

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

2.3.3. Esterilización del suelo para los tratamientos

Se llevó a cabo la esterilización del suelo nativo donde se sospechaba la presencia de *Pseudomonas* sp por lo que para poder realizar los cálculos estadísticos de eficiencia en los tratamientos se realizó la esterilización mediante presión de vapor de agua desmineralizada en autoclave a 120° C durante 15 minutos (**Ilustración 2-2**),y así poder realizar bioaumentación en nuestro nuevo suelo estéril aplicando la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y la bacteria *Pseudomonas* sp.

Cabe recalcar que al someter a la esterilización del suelo los TPHs se redujeron en un 50 % ya que sufre la evaporación de cierto compuesto hidrocarbúferos tanto orgánicos como inorgánicos.

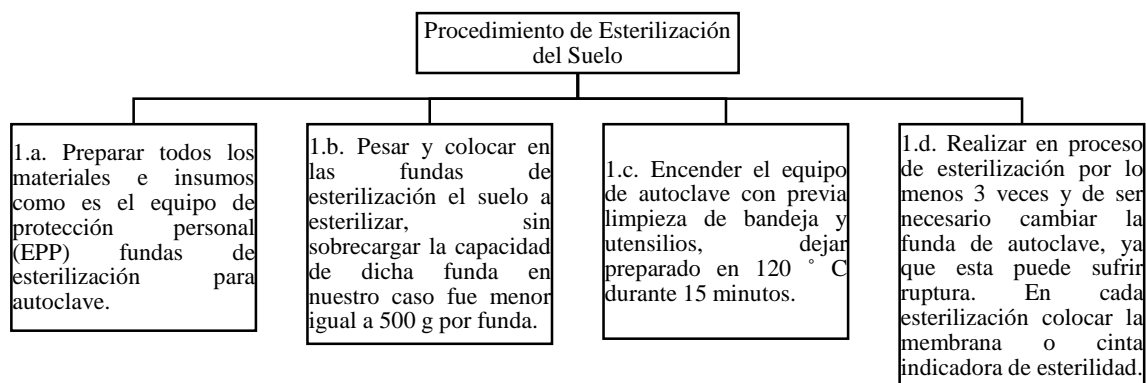


Ilustración 2-2.Procedimiento de esterilización del suelo.

Realizado por: Edwin Licata, 2019

2.3.4. *Análisis físico-químicos de las muestras de suelo*

Para realizar el análisis físico-químico(temperatura (T°), pH, humedad, conductividad eléctrica (CE), materia orgánica (MO), carbono orgánico total (COt), nitrógeno(N), fósforo(P)) (**Ilustración 3-2**) fue necesario el control del tiempo (**Tabla 3-2**).

Para ello se utilizó la metodología basada en el libro Standard Methods For Examination of Water and Wastewater (APHA; AWWA; WEF., 2017), EPA Methods y ASTM con la finalidad de realizar una descripción rápida, mas no un procedimiento exacto ya que se firmó un acuerdo de confidencialidad con el laboratorio privado, AQLAB, por ende las fórmulas y cálculos de los mismos quedan archivadas en el sistema del laboratorio.

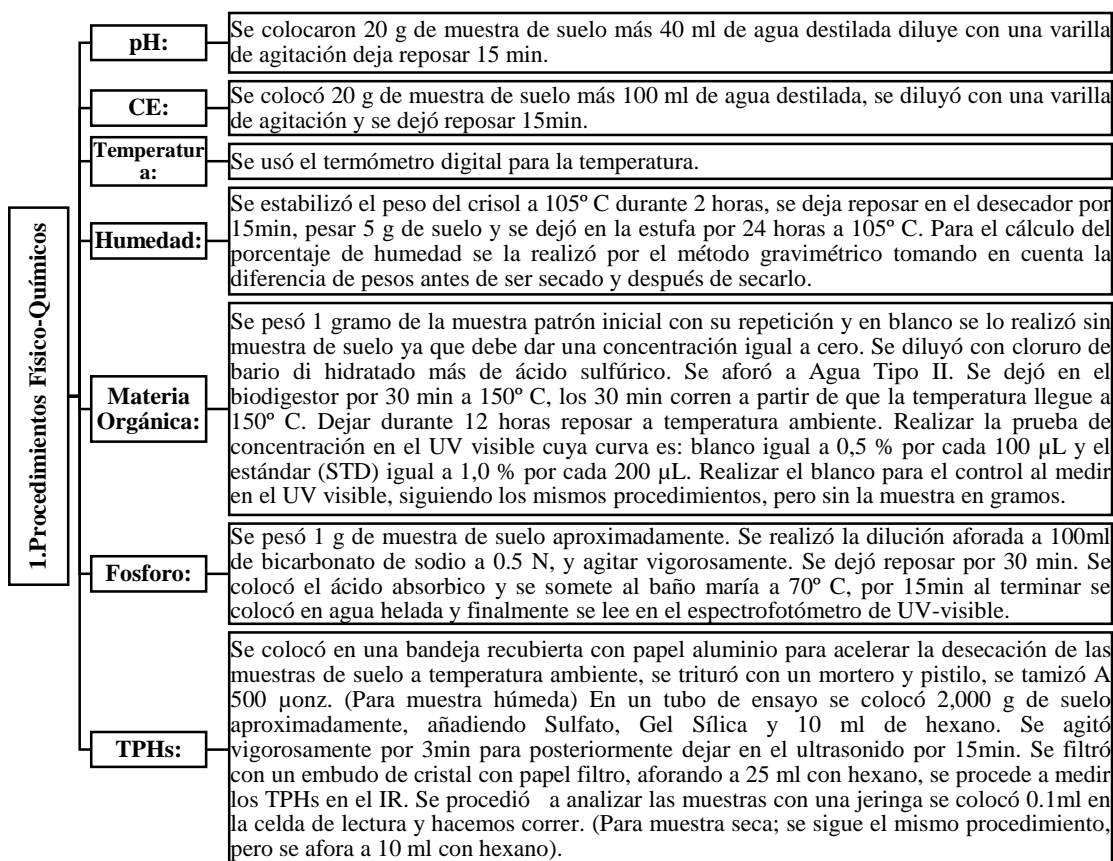


Ilustración 3-2. Procedimiento físico químicos de la investigación.

Realizado por: Edwin Licata, 2019

Tabla 3-2: Tiempo de control para las condiciones físico-químicas-microbiológicas.

Cubetos	*TPHs/UFC	*COt/Nt/P/N	*pH, CE	Oxigenación / Irrigación/ T° / % humedad.
S1.a	0 días			
S1.b	20 días	0 días		
S1.c	40 días	40 días	semanalmente	3 a 5 veces por semana
S1.d	60 días	80 días		
	80 días			
S2.a	0 días			
S2.b	20 días	0 días		
S2.c	40 días	40 días	semanalmente	3 a 5 veces por semana
S2.d	60 días	80 días		
	80 días			

* Los cubetos con el suelo nativo estéril representados con la letra S1 es el cubeto con la bacteria autóctona y S2 es el cubeto con la bacteria comercial. Las letras a, b, c, d son las 4 réplicas requeridas para cálculos estadísticos.

* TPHs= hidrocarburo total de petróleo, UFC= Unidades Formadoras de Colonias, COt= Carbono Orgánico Total, Nt= Nitrógeno Total, P= Fosforo, pH= Potencial Hidrogeno, CE= Conductividad Eléctrica T°= Temperatura.

Realizado por: Edwin Licata, 2019

2.3.5. Medios de cultivo usados en la investigación

La siembra de microorganismos del suelo fue realizada en un medio selectivo Difco™ *Pseudomonas* Isolation Agar (DPI). También fue necesaria la utilización de otros medios y caldos para el aislamiento de la *Pseudomonas* sp como el agua de peptona tamponada, agar para métodos estándar placa de 90 mm (PCA), caldo infusión cerebro corazón (BHI) (Figura 4-2), explicadas con mayor detalle en el Anexo H.



Figura 4-2. Medios de cultivo plate count agar (PCA), difco™ *Pseudomonas* isolation Agar (DPI), caldo infusión cerebro corazón (BHI).

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

2.3.6. Aislamiento de bacterias

Para verificar la posible presencia de *Pseudomonas* sp. se realizaron cultivos de las colonias obtenidas en agar DIP y PCA para su posterior incubación en agar BHI a 35° C por 24 h. Al cabo de 24 h y 48 h se examinaron los cultivos de las cajas Petri siempre estableciendo un blanco para la verificación de que el medio no esté contaminado con ningún tipo de microorganismos. Aquellos aislamientos que presentaron pigmentación azul/verde o marrón amarillenta (Palleroni, 1984; 2005), debido a la producción de piocianina o pioverdina fueron considerados positivos para la realización del tratamiento de biodegradación (APHA; AWWA; WEF., 2017).

Además, los aislamientos seleccionados se crioconservaron en una solución de leche descremada (v/v) y agua destilada (v/v) a -10°C. A partir de las muestras de suelo, fueron seleccionados 10 aislamientos de *Pseudomonas* sp, tomando como criterio de selección las características macroscópicas como la fluorescencia que estas bacterias presentaron en agar DPI

y características morfológicas, para así crioconservarlas en la solución a -10° C. Además, se activó la bacteria comercial *P. aeruginosa* del cual se incubaron en agar PCA (APHA; AWWA; WEF., 2017).

2.3.7. Verificación en placa de bacterias presentes en el suelo.

El recuento de la bacteria autóctona (*Pseudomonas* sp.) se realizó mediante el procedimiento convencional para un cultivo de microorganismos del suelo diluidos en agua de peptona según el método estándar internacional (APHA; AWWA; WEF., 2017), cultivados en el medio ya descrito anteriormente PCA y DIP. Además, del agua de peptona para la reducción de la concentración microbiana mediante dilución (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-8}). La disolución para los medios fue realizada con agua destilada, de acuerdo con las especificaciones de la ficha técnica de cada medio de cultivo o caldo (**Tabla 4-2**).

Tabla 4-2: Pesos para medio de cultivo bacteriano

Medio	Peso (g)	Vol.(ml)	Glicerol (ml)
Peptona	2,55	1000	
Agar PCA	5,6	300	
Difco™ <i>Pseudomonas</i> Isolation Agar	6,75	250	3

Realizado por: Edwin Licta, 2019

2.3.8. Aislamiento de la *Pseudomonas* sp.

El procedimiento se lo realizó de acuerdo a la metodología usada en el laboratorio (**Ilustración 4-2**), basados en el libro de Standard Methods N°. 9213E y la Association of Official Analytical Chemist (AOCA, 2003.07.2005) por el acuerdo de confidencialidad con el laboratorio auspiciante se omitirá algunos detalles relevantes.

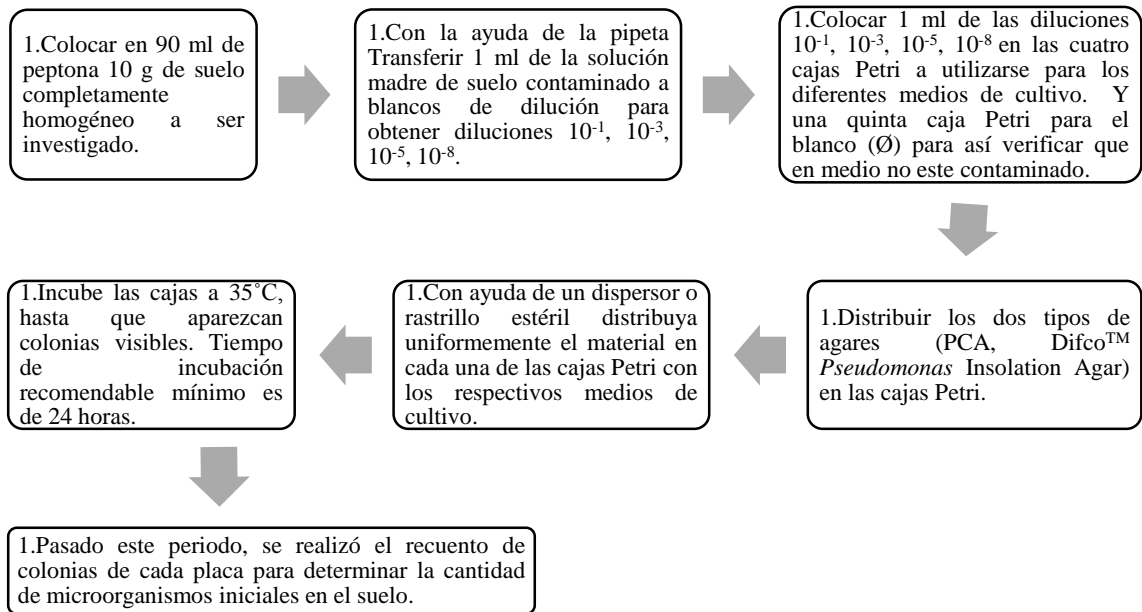


Ilustración 4-2. Procedimiento para siembra de *Pseudomonas* sp.

Realizado por: Edwin Licta, 2019.

2.3.9. Activación de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*

En la **Ilustración 5-2** se detalla el método estandarizado por laboratorios AQLAB debidamente aprobado por el proveedor integral MEDILAB.

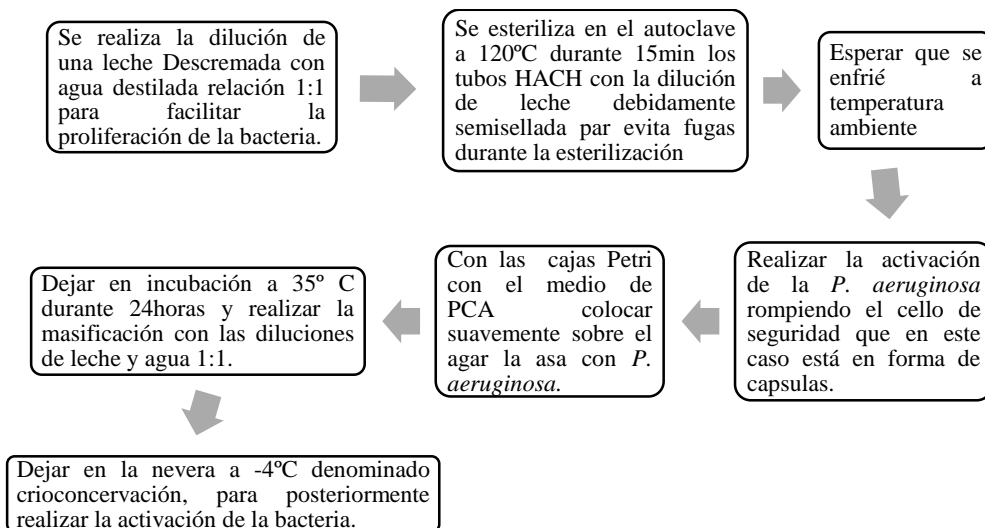


Ilustración 5-2. Procedimiento deMediLabpara activar la *Pseudomonas aeruginosa*.

Realizado por: Edwin Licta, 2019.

2.3.10. Reactivación y masificación de las cepas de *Pseudomonas sp.*

El método de aislamiento propuesto por Palleroni (1984) para aislar bacterias degradadoras de petróleo se lo realizó con la adición del caldo nutritivo para *Pseudomonas sp.* (**Ilustración 6-2**).

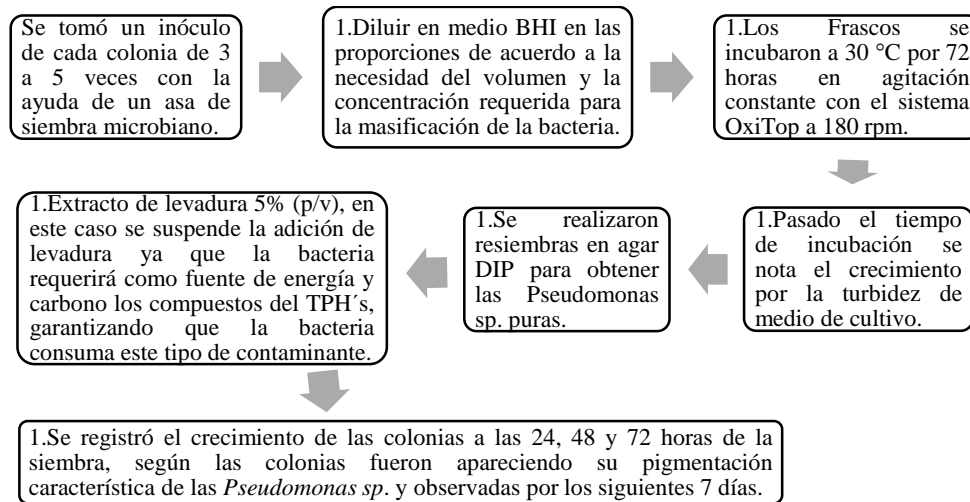


Ilustración 6-2. Procedimiento para reactivar y masificar de las cepas de *Pseudomonas sp.*

Realizado por: Edwin Licta, 2019

2.3.11. Estabilización de las colonias

Muchas veces las bacterias sobreviven a la siembra en placa gracias a la reserva de nutrientes que llevan consigo y no siempre debido a los nutrientes que un determinado medio les proporciona; por ende, fue necesario asegurar su posterior crecimiento repicándolas en un medio rico de nutrientes (DIP) para recuperar su crecimiento y después repicarlas en los tres distintos medios hasta estabilizar su crecimiento y con esto garantizar su posterior uso durante los ensayos restantes (**Ilustración 7-2**).

De igual forma para la culminación de esta investigación fue necesario estabilizar las colonias para evitar la proliferación de las bacterias. Para ello se sometió a condiciones ambientales naturales extremas, eliminando las condiciones óptimas de crecimiento, para reducir la carga microbiana y así cumplir con la normativa de las UFC máximas permitidas en suelos.

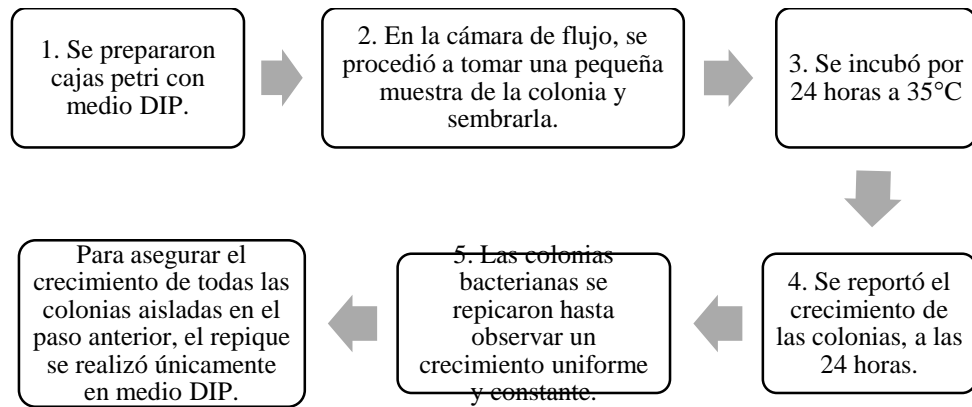


Ilustración 7-2. Procedimiento para estabilizar las colonias.

Realizado por: Edwin Licta, 2019.

2.4. Eficiencia

La eficiencia de las bacterias se determinó en base a los factores principales de este tipo de investigación como son: los niveles de biodegradación de TPHs y las condiciones físico-químicas iniciales, medias y finales de los dos tratamientos y la muestra patrón, mediante la aplicación de la ecuación 1-2. $THP_{i=n}$

$$\text{Ecuación 1-2. Cálculo de eficiencia simple. } \%E = 100 - \frac{THP_{i=n} * 100}{THP_o}$$

2.5. Planteamiento de hipótesis

2.5.1. Hipótesis textual

La bacteria autóctona aislada (*Pseudomonassp.*) es más eficiente en la biodegradación de TPHs en comparación a la bacteria comercial *Pseudomonas aeruginosa*.

2.5.2. Hipótesis estadísticas

2.5.2.1. Hipótesis nula

H_o : La bacteria autóctona y comercial tienen la misma capacidad de biodegradación de TPHs mediante la bioaumentación del suelo contaminado con bacterias específicas al someterlas a las mismas condiciones físico-químicas.

$$H_o: \mu_{S1} = \mu_{S2}$$

2.5.2.2. Hipótesis alternativa

H_1 : La bacteria autóctona y comercial tiene diferente capacidad de biodegradación de TPHs mediante la bioaumentación, al someterlas a las mismas condiciones físico-químicas.

$$H_1: \mu_{S1} \neq \mu_{S2}$$

Donde:

μ_{S1} = Suelo nativo estéril bioaumentado con la bacteria comercial *Pseudomonas aeruginosa*.

μ_{S2} = Suelo nativo bioaumentado con la bacteria autóctona *Pseudomonas* sp.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de resultados

Para evaluar la eficiencia de la bioaumentación con la finalidad de biodegradar TPHs como tratamiento para los pasivos ambientales que son almacenados en el laboratorio AqLab, fue necesario realizar los análisis físico-químicos iniciales, medios, finales de parámetros como carbono orgánico total (COT), materia orgánica (MO), fósforo (P) y nitrógeno (N), mediante un monitoreo diario de parámetros físicos como temperatura e irrigación, monitoreo semanal de humedad, pH, conductividad eléctrica (CE) y cada 20 días TPHs y el control biológico de la presencia de *Pseudomonas*.

Así, la recopilación de datos mediante el control mencionado genera datos estadísticos que permitirán realizar los cálculos de eficiencia y mantener las condiciones del suelo en condiciones óptimas para que la bacteria trabaje en la biodegradación de TPHs.

3.1.1. *Evaluación de las características físicas, químicas del suelo.*

Los parámetros físico-químicos analizados en la investigación de los pasivos ambientales contaminados con TPHs se presentan en la **Tabla 1-3**, la misma que fue extraída de los informes respaldados por el certificado de control de calidad de AQLAB anexadas, cuyos resultados preliminares evidenciaron que en las condiciones físico-químicas del suelo, están en el punto medio de los límites permisibles de la normativa legal vigente del Ecuador y por ende internacionalmente. Además, se tomó referencia en el criterio de calidad de los parámetros mínimos de la fertilidad del suelo en TULSMA libro VI, Decreto Ejecutivo 3516 y las referencias citadas en la **Tabla 1-3**.

Tabla 1-3: Parámetros Físicos - Químicos Analizados en la investigación.

Parámetro	Referencia	Unidad	Resultados de Análisis			Límites Permisibles		
			Inicial (0 Días)	Medio (40 Días)	Final (80 Días)	Mínimo	Media	Máximo
pH	EPA 9045C	-	7,32	7,3	7,64	6	-	8
Conductividad eléctrica	EPA9050A	mmho/cm	240	288	252	-	-	< 2000
Humedad	ASTM D3976-92	%	73	67	68	50	-	70
Materia orgánica	Gravimétricos	%	4,12	2,6	1,74	≤1,0	1,0-2,0	≥ 2
*Carbono Orgánico Total	EPA 9060	%	2,5	1,5	1	≤0,6-1,5	1,5-3,0	3,0-≥6,0
*Nitrógeno Total	KJEDAHI, EPA351.2	%	0,216	0,13	0,09	0-0,15	0,16-0,3	≥0,31
Fosforo	Booker Tropical Soil Manual	mg/K g	257,3	206,7	1447,2	0-10,0	11-20	≥21

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

* Relación porcentual de C/N 11,6 está dentro de los parámetros ya que la normativa no determina la precisión del límite permisible de la cantidad de materia orgánica, nitrógeno y fosforo en cuanto a la relación C/N estará <30 como máximo para un suelo agrícola.

3.2. Evaluación del tratamiento

El primer grupo de cubetos: S1.a, S1.b, S1.c, S1.d que corresponde al suelo nativo estéril con sus respectivas 4 réplicas (a, b, c y d) (**Figura 1-3**) fue bioaumentado con las colonias bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* (S1).

El segundo grupo de cubetos: S2.a, S2.b, S2.c, S2.d, que corresponde al suelo nativo estéril con sus respectivas 4 réplicas (a, b, c y d) fue bioaumentado con la bacteria *Pseudomonas* sp. previamente aislada del mismo suelo (S2), (**Figura 2-3**) y para el suelo patrón en forma de biopila denominado S3 la cual no se procedió a realizar réplicas cuyo fin para dar disposición final al total del suelo contaminado se realizó la bioaumentación con la bacteria *Pseudomonas* sp.



Figura 1-3. Cubetos con 2 kg de suelo cada una, tratado con la *Pseudomonas aeruginosa* denominado suelo nativo estéril (S1) y sus réplicas S1.a, S1.b, S1.c, S1.d.

Realizado por: Edwin Licata, 2019.



Figura 2-3. Cubetos con 2 kg de suelo cada una, tratado con la *Pseudomonas* sp. denominado suelo nativo estéril (S2) y sus réplicas S2.a, S2.b, S2.c, S2.d.

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

3.2.1. Evaluación de los TPHs durante el tratamiento

A diferencia de los resultados físico-químicos anteriores, los TPHs del suelo a ser tratado están por muy encima de los límites permisibles en Ecuador establecidos en el Decreto Ejecutivo Ecuatoriano 1215 (RAOHE).

Tabla 2-3: Comparación de los resultados de TPHs durante el tratamiento.

Muestra de suelo	TPHs en las muestras			Límites permisibles			Unidad
	Inicial (0 Días)	Medio(40 Días)	Final(80 Días)	Uso agrícola	Uso industrial	Ecosistemas sensibles	
°S1	9366	5150	1996	<2500	<4000	<1000	mg/kg
°S2	8977	2992	994	<2500	<4000	<1000	mg/kg
°S3	20640	7710	*739	<2500	<4000	<1000	mg/kg

° La representación de las siglas S1 es el suelo estéril nativo bioaumentado con *Pseudomonas aeruginosa*, S2: es el suelo estéril nativo bioaumentado con *Pseudomonas* sp; S3: es el suelo patrón no estéril bioaumentado con *Pseudomonas* sp.

* Son los TPHs finales después de 100 días de tratamiento para dar disposición final al total del suelo.

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

Para realizar los tratamientos con sus respectivas repeticiones, se llevó a cabo la división en 8 cubetos con 2 Kg de suelo contaminado cada uno, dividido en 2 variables: la bacteria usada para la inoculación y los TPHs biodegradados en los 80 días de tratamiento (**Tabla 2-3**).

Para el ensayo fue necesario homogenizar el suelo y la esterilización de este, evitando así la presencia de otros microorganismos al momento de la bioaumentación con la bacteria aislada (*Pseudomonas* sp) y la bacteria comercial (*Pseudomonas aeruginosa*), que pueden afectar los resultados de los cálculos estadísticos.

Como consecuencia de la esterilización, los TPHs pueden reducirse significativamente en las muestras evaluadas, dando como resultado una reducción promedio del 56 % a la concentración inicial de TPHs de la muestra patrón; esto se da debido a que poseen compuestos orgánicos volátiles y temperatura de ebullición distintas.

Por ello los resultados iniciales del tratamiento muestran una reducción de un promedio de 20640 mg/Kg en muestra de TPHs a un inicial de 9366mg/Kg para el ensayo con *Pseudomonas aeruginosa* y 8977 mg/Kg para el ensayo con *Pseudomonas* sp. Su reducción promedio final de los TPHs fue 1996 mg/Kg en muestras con *Pseudomonas aeruginosa* (**Grafica 1-3**) y 994mg/Kg en muestras con *Pseudomonas* sp (**Grafica 2-3**).

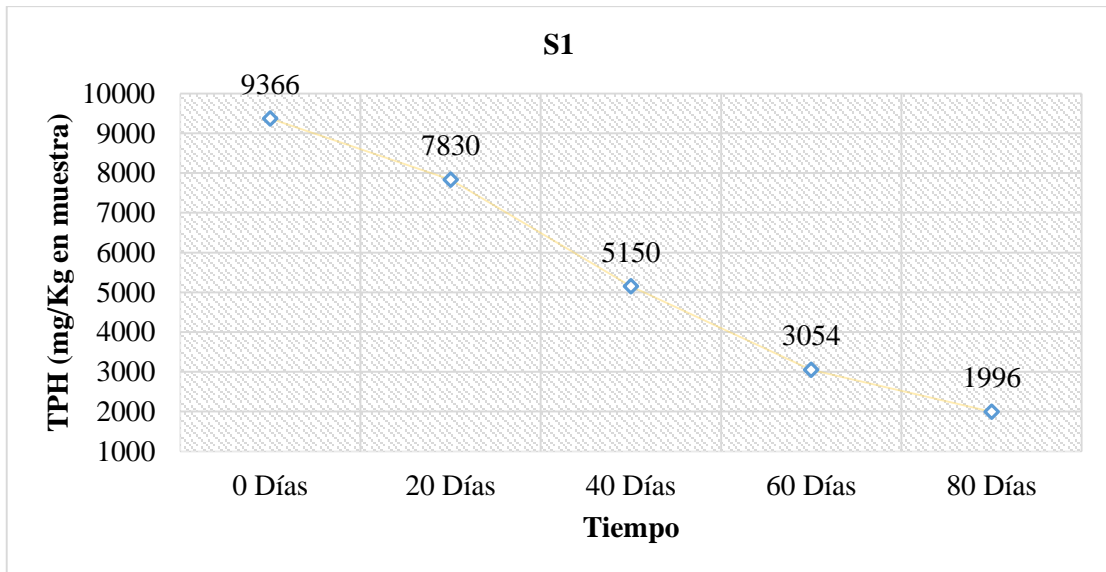


Gráfico 1-3. Biodegradación de TPHs promedio en función del tiempo durante los 80 días de tratamiento con *Pseudomonas aeruginosa* (S1).

Realizado por: Edwin Licta, 2019

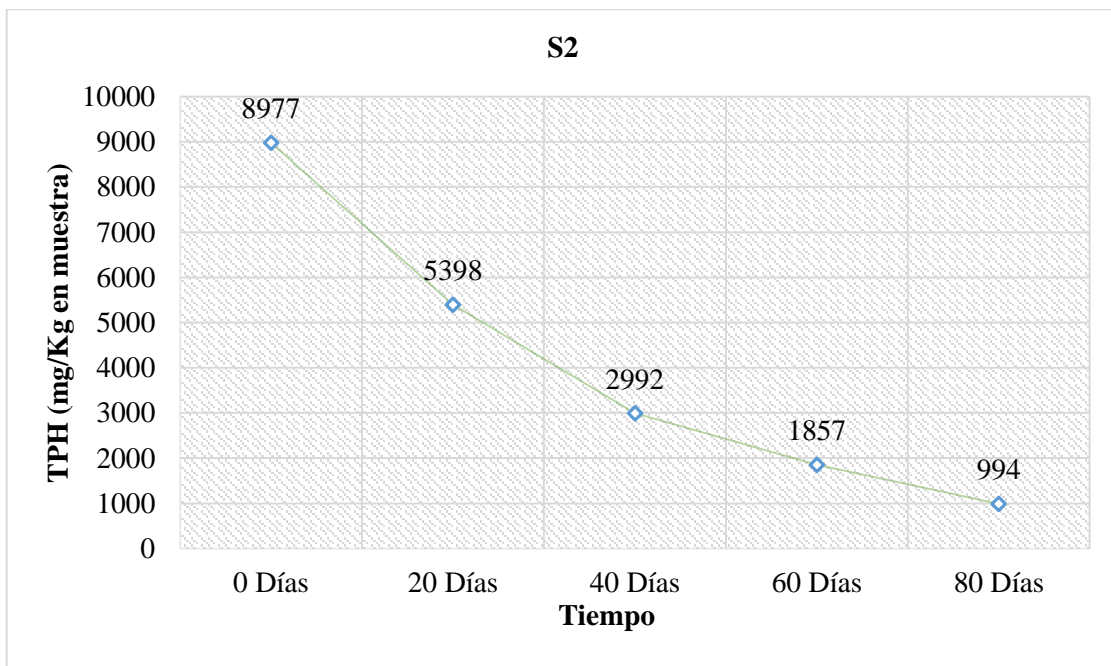


Gráfico 2-3. Biodegradación de TPHs promedio en función del tiempo durante los 80 días de tratamiento con *Pseudomonas sp*(S2).

Realizado por: Edwin Licta, 2019

Podemos notar que la mayor concentración de TPHs decreció en los 20 primeros días de tratamiento en los cubetos bioaumentado con *Pseudomonas sp* (S2) a diferencia de los cubetos con *Pseudomonas aeruginosa*(S1) que decreció los TPHs, pero en menor porcentaje a comparación del segundo tratamiento S2. A partir de aquí, se procedió con la bioaumentación

únicamente usando *Pseudomonas* sp ya que el fin de la investigación es reducir costos que generen altos beneficios socio-económicos.

Además, la muestra patrón no fue esterilizada y el análisis de los pasivos ambientales se los hizo directamente. Debido a que por disposición del Laboratorio auspiciante el límite permisible debe ser <1000 mg/Kg exclusivo para ecosistemas sensibles, según el Decreto Ejecutivo 1215, la evaluación de la biodegradación de TPHs se extendió durante 20 días más de los 80 días de tratamiento. Al terminar el tratamiento, el suelo cumple con los límites permisibles de normativa legal vigente teniendo un resultado final de TPHs en muestra de 736 mg/Kg (**Gráfico 3-3**).

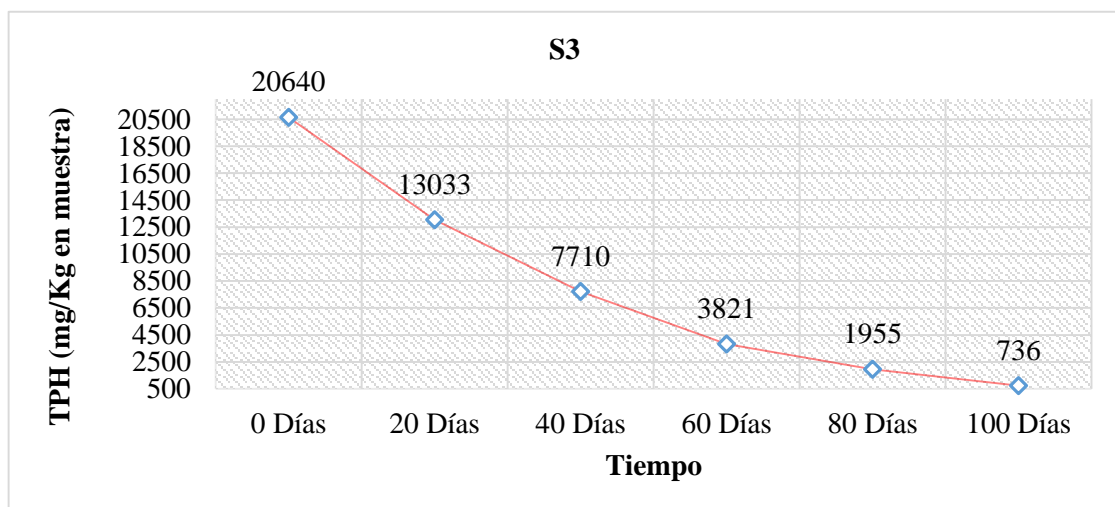


Gráfico 3-3. Biodegradación de los TPHs de la muestra patrón no estéril en 100 días de tratamiento con *Pseudomonas* sp(S3).

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

3.2.2. Análisis de la conductividad eléctrica durante el tratamiento

La conductividad eléctrica se midió para verificar que tan propenso es el suelo de sufrir una erosión durante el tratamiento, asegurando de esta forma la calidad del suelo en procesos de biorremediación de suelos contaminados con TPHs, según la normativa del RAOHE o el TULSMA. Esta menciona que para uso agrícola del suelo debe mantenerse por debajo de los 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, por ello en la gráfica se aprecia que se mantuvo por muy debajo del límite permisible, dando como resultado un máximo de 738 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y un mínimo de 208 $\mu\text{S}/\text{cm}$ durante todo el tratamiento; cuyo promedio general para los 3 tratamientos (S1: es el suelo estéril nativo bioaumentado con *Pseudomonas aeruginosa*, S2: es el suelo estéril nativo bioaumentado con *Pseudomonas* sp; S3: es el suelo patrón no estéril bioaumentado con *Pseudomonas* sp), fue igual a 449 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (**Tabla 3-3; Gráfico 4-3**).

Tabla 3-3: Parámetros analizados de la conductividad eléctrica durante el tratamiento.

Análisis Semanas	Conductividad Eléctrica Promedio (CE = $\mu\text{S}/\text{cm}$)		
	S1	S2	S3
1	527	478	240
2	538	484	268
3	494	452	289
4	403	343	360
5	440	418	315
6	375	414	254
7	375	361	321
8	322	293	260
9	459	457	280
10	493	442	215
11	609	551	233
12	530	511	208

Realizado por: Edwin Licta, 2019.

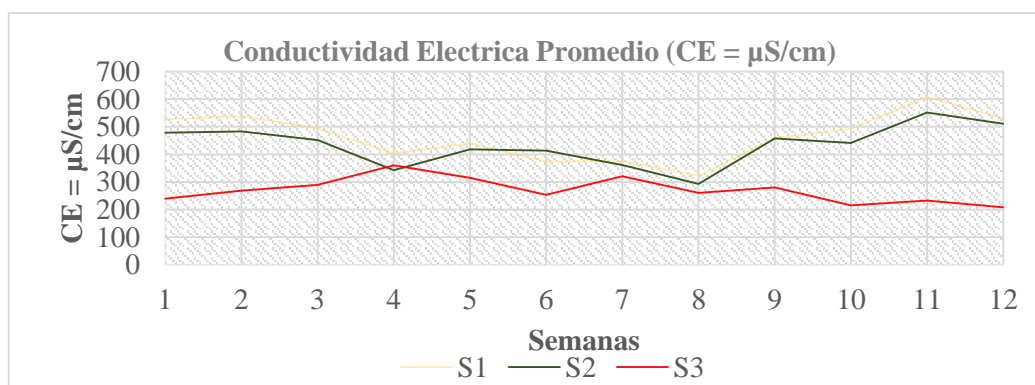


Gráfico 4-3. Carta control semanal de la conductividad eléctrica del suelo tratado con *Pseudomonas aeruginosa* vs *Pseudomonas spen* el S1, S2, S3.

Realizado por: Edwin Licta, 2019⁹.

3.2.3. Análisis del pH durante el tratamiento

El pH, según lo mencionado en las bases teóricas en estudios de Palleroni (1992), es fundamental para el estudio de estas bacterias en la degradación de TPHs, mencionando que las condiciones óptimas para la bacteria deben estar entre 5 a 9. Pero en el Libro VI del TULSMA, Anexo 2; para un suelo en proceso de biorremediación, el pH del suelo debe ser de 6 a 8 siendo el rango óptimo mínima y máxima de crecimiento bacteriano, por ende, se puede afirmar que durante todo el tratamiento el suelo no pierde las condiciones óptimas para que el suelo tenga una disposición final como uso agrícola, cuyo máximo rango de pH fue 7,88 y el mínimo fue 6,11 por ende el promedio general en este cubeto es 7,19 (Tabla 4-3; Gráfico 5-3).

Tabla 4-3: Promedio de parámetros analizados del pH durante el tratamiento.

Análisis Semanas	pH Promedio Semanal		
	S1	S2	S3
1	7,28	6,88	6,9
2	7,64	7,35	7,85
3	7,86	7,14	7,64
4	7,55	7,39	7,52
5	7,49	7,61	7,45
6	7,45	7,16	6,43
7	7,31	7,07	7,42
8	6,46	6,46	7,15
9	7,29	7,16	7,29
10	6,31	6,32	6,62
11	7,10	7,38	7,6
12	7,51	7,44	7,64
Promedio general:			7,20

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

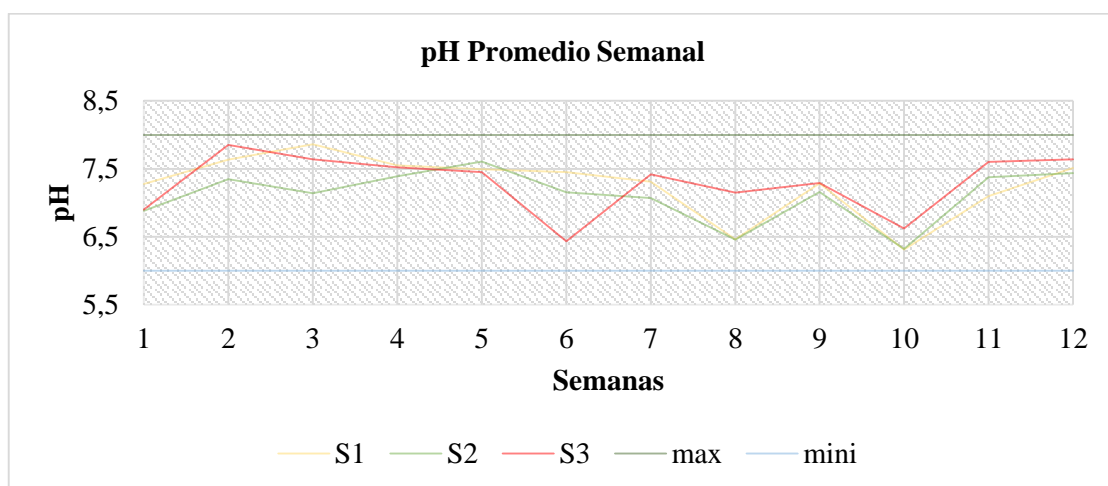


Gráfico 5-3. Carta control semanal del pH en 80 días de tratamiento en el suelo nativo estéril con *P. aeruginosa* (S1), *Pseudomonassp* (S2); y suelo no estéril *Pseudomonassp* (S3).

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

3.2.4. Análisis de la temperatura durante el tratamiento

La gráfica de control de temperatura se basa en los primeros estudios de Palleroni (1992), donde estudia el género *Pseudomonas*, mencionando el rango de tolerancia mínima ($T^{\circ} \text{ min}$) de 20° C y el máximo 42° C ($T^{\circ} \text{ max}$). Sin embargo, las condiciones óptimas de crecimiento para estas bacterias deben ser entre 30° C a 35° C ; por ello se tomó la temperatura diariamente cuyos resultados se encuentran en los anexos, y en la gráfica contigua se muestra solo los promedios semanales están dentro del rango de tolerancia, y cuyo promedio final es de 31° C donde en todo

el tratamiento la temperatura mínima de 27° C a un máximo de 36.1° C (Tabla 5-3; Grafico 6-3).

Tabla 5-3: Resultados del parámetro temperatura promedio semanal durante el tratamiento.

Análisis Semanas	Temperatura Promedio Semanal (°C)		
	S1	S2	S3
1	31,5	31,9	31,7
2	34,0	34,8	34,4
3	29,9	30,2	29
4	34	34,4	32,9
5	34	35,3	31,9
6	30,4	30,8	27,8
7	27,6	27,7	27
8	29,4	28,0	27,2
9	30,2	30,6	28,4
10	29,3	30,5	30,7
11	29,4	30,3	30,5
12	30,7	31,1	31,1
Promedio general:			31

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

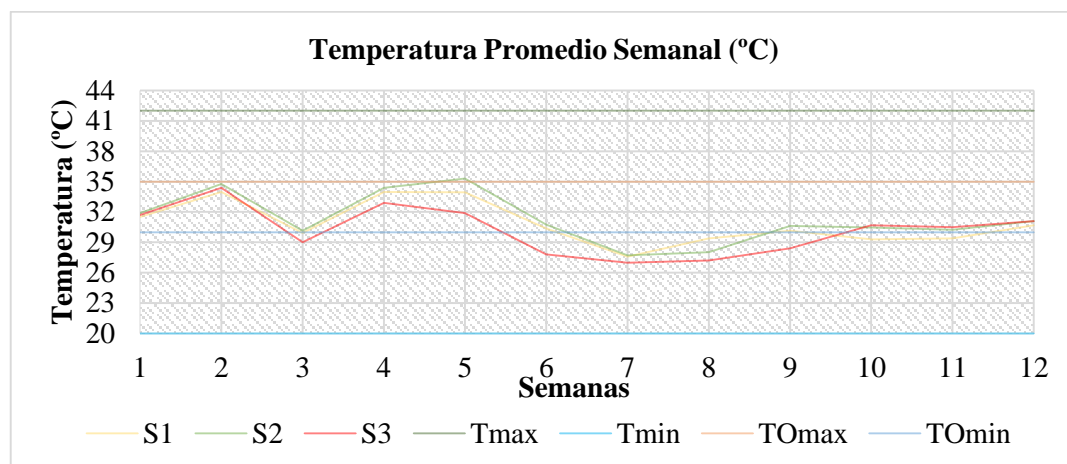


Gráfico 6-3: Carta control promedio semanal de temperatura durante el tratamiento.

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

*Suelo estéril con *P. aeruginosa* (S1), *Pseudomonas* sp (S2), y suelo no estéril con *Pseudomonas* sp S3.*Temperatura óptima de crecimiento máximo y mínimo (Tmax, Tmin), Temperatura de tolerancia máxima y mínimo (TMax, TMin).

3.2.5. Análisis de la humedad durante el tratamiento

Según las investigaciones de Palleroni (2005), las condiciones óptimas de crecimiento *Pseudomonas* sp deben mantener un rango de humedad entre 50% a 70%, importante para el desplazamiento de la bacteria entre las partículas del suelo y buscar su fuente de energía y carbono para su crecimiento.

Los resultados al cabo de 12 semanas de tratamiento iniciaron con una humedad del 87 %, la cual se controló dentro del invernadero para que cumpla el rango de crecimiento óptimo, manteniéndolo en un rango casi del límite máximo y mínimo para la bacteria, dificultándose por las condiciones climáticas de Prt. Fráncico de Orellana, pero llegando a tener un promedio general igual al 66.7% (**Grafico 7-3; Tabla 6-3**).

Tabla 6-3: Resultados de los parámetros temperatura promedio semanal durante el tratamiento.

Análisis Semanas	Humedad Promedio Semanal (%)		
	S1	S2	S3
1	83	84	73
2	71	69	61
3	73	73	71
4	70	72	57
5	55	58	63
6	63	65	87
7	61	62	62
8	62	63	72
9	64	62	63
10	69	68	68
11	62	68	71
12	62	61	66
	Promedio general		66.7

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

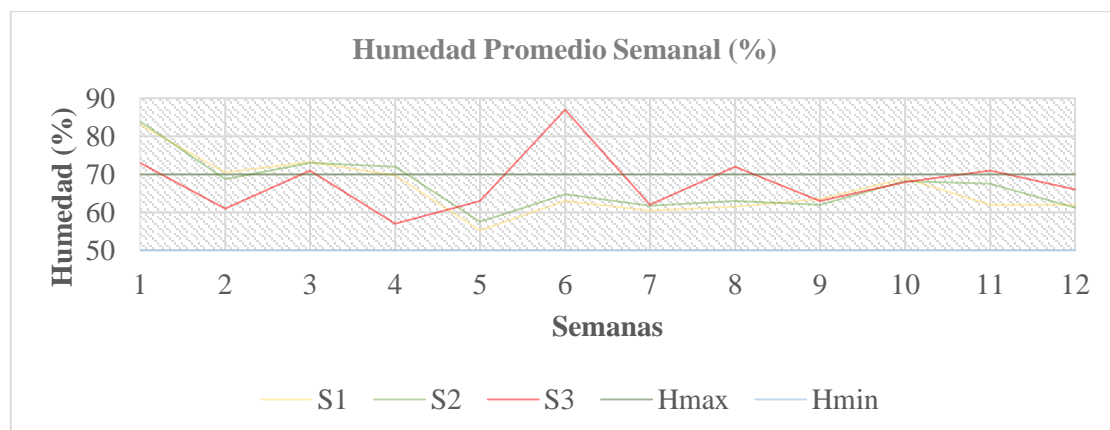


Gráfico 7-3. Porcentaje de humedad durante los 80 días de tratamiento.

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

3.3. Características biológicas

3.3.1. La caracterización morfológica de las *Pseudomonas* sp.

Las características morfológicas de las colonias *Pseudomonas* sp mostraron una pigmentación amarillo-marrón en las primeras 24 horas de incubación a 35° C (**Figura 3-3**), cambiando a rojo fluorescente a partir de las 48 horas de observación en incubación. También se verificó la presencia de flagelos polares por lo que se apreció un mínimo desplazamiento de las colonias a término de los 7 días de observación. Características como: presencia de la pigmentación fluorescente color rojizo (**Figura 4-3**), ser bacilos Gram negativos aerobios no esporulados móviles, presencia de flagelos que le permiten moverse por el suelo (**Figura 5-3**), así como diámetros promedio de entre 0,6 a 2 μm , ayudaron confirmar que la bacteria aislada pertenece al género *Pseudomonas*, según varias investigaciones realizadas por el científico Palleroni N.J.(2005) a lo largo de la historia.

Debido a que en la empresa auspiciante AQLAB no cuenta con la acreditación del SAE (ANEXO 19) para una caracterización bioquímica y molecular, se decidió dejar las cepas aisladas como pertenecientes al género *Pseudomonas* sp, creando el certificado de calidad de la bacteria y continuando con el procedimiento de la investigación.

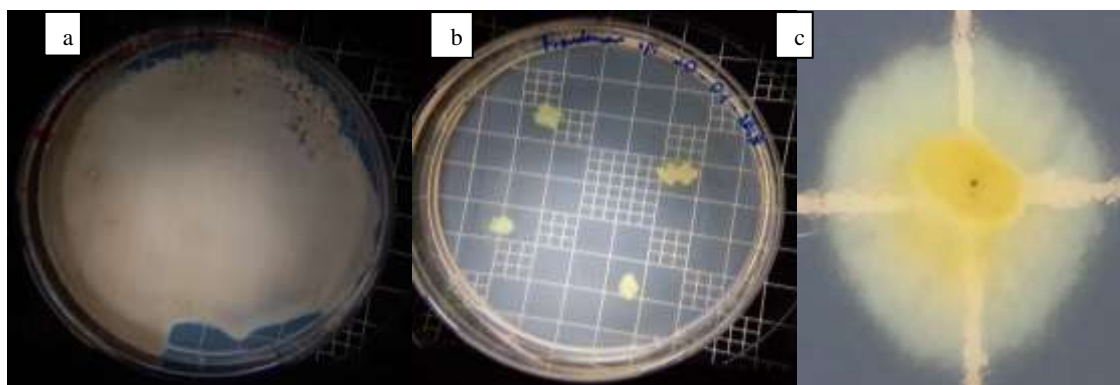


Figura 3-3. (a) Aislamiento de *Pseudomonas* sp por 24 horas de incubación de la dilución 10^{-1} , (b) repique de la bacteria (c) Morfología de la bacteria.

Realizado por: Edwin Licata, 2019.u

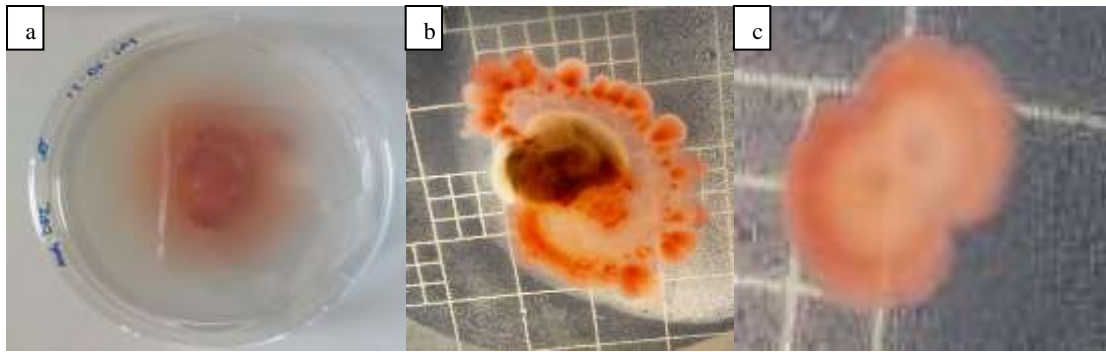


Figura 4-3. Aislamiento de una colonia de *Pseudomonas* sp. (a) 48 horas de incubación a 35° C (b-c) 72 horas de incubación a 35° C,

Realizado por: Edwin Licta, 2019.

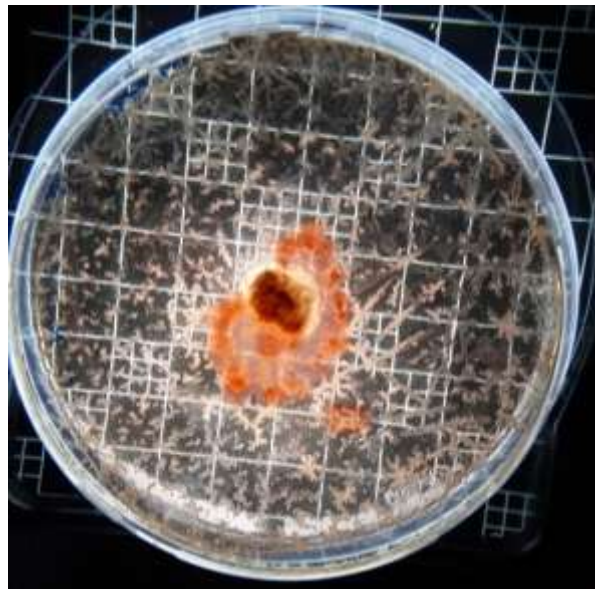


Figura 5-3. Aislamiento y desplazamiento de una colonia de *Pseudomonas* sp los 7 días de incubación a 35° C.

Realizado por: Edwin Licta, 2019.

3.3.2. Caracterización de *Pseudomonas aeruginosa*

La activación de la bacteria *P. aeruginosa*, como se detalla en el marco conceptual, presentó un color amarillo marrón con tonos traslucidos y el conteo de UFC inicial de la bacteria no nos supuso un dato relevante debido a que la masificación de las UFC aumentó exponencialmente. Por ello el control de presencia de la bacteria se realizó cada 20 días, si la

presencia de *Pseudomonas* empieza a decrecer en su número de colonias se realizó la masificación para la bioaumentación (**Figura 6-3**).

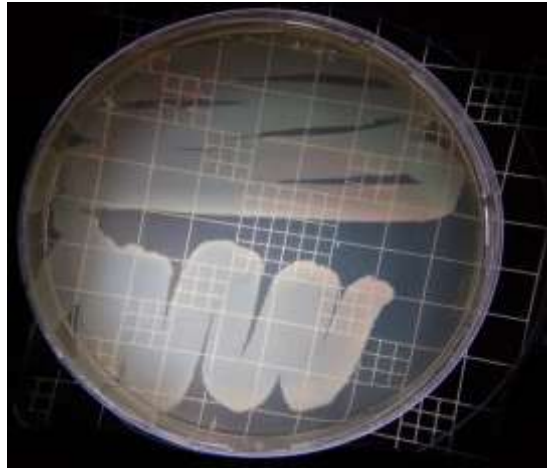


Figura 6-3. *P. aeruginosa* incubada a 35° C por 24 horas.

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

3.3.3. Control de la presencia de *Pseudomonas*

Se realizó la verificación de las colonias de la bacteria *Pseudomonas* presentes en el suelo contaminado al inicio, durante y al finalizar el tratamiento de la biodegradación de los TPHs, tal como se muestra en los resultados de las tablas contiguas. Los resultados son favorables gracias al control periódico de la presencia bacteriana cada 20 días durante todo el tratamiento, realizando dos masificaciones al inicio y a los 60 días ya que la presencia en colonias de *Pseudomonas* sp y *P. aeruginosa* empezó a sufrir un decrecimiento en las UFC que al ser masificado en este no se puede realizar el conteo, y al cabo de 60 días de tratamiento este sufrió una reducción de las UFC contándolas con facilidad.

En cada control se registró la presencia o ausencia de las colonias de *Pseudomonas* sp más no el conteo de las colonias ya que al masificar la bacteria fue imposible realizar el conteo de UFC en las diluciones 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-8} realizadas para la verificación de la presencia de *Pseudomonas*. (**Tabla 7-3**).

Tabla 7-3: Control del tratamiento de la *P. aeruginosa* (S1), *Pseudomonas* sp (S2) presentes en el suelo estéril y *Pseudomonas* sp presentes en el suelo patrón no estéril (S3).

Días de Tratamiento	Fecha	Código	UFC (diluciones)				
			Blanco	10 ⁻¹	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻⁸
0 días	18/04/2019	S3	0	230	90	15	0
		S3	0	200	85	12	-
		S3	0	200	64	14	-
20 días	08/05/2019	S1.a	0	-	I	I	-
		S1.b	0	-	I	I	-
		S1.c	0	-	I	I	-
		S1.d	0	-	I	I	-
		S2.a	0	-	I	I	-
		S2.b	0	-	I	I	-
		S2.c	0	-	I	I	-
		S2.d	0	-	I	I	-
40 días	27/05/2019	S1.a	0	-	I	-	-
		S1.b	0	-	I	-	-
		S1.c	0	-	I	-	-
		S1.d	0	-	I	-	-
		S2.a	0	-	I	-	-
		S2.b	0	-	I	-	-
		S2.c	0	-	I	-	-
		S2.d	0	-	I	-	-
60 días	12/06/2019	S1.a	0	131	-	-	-
		S1.b	0	275	-	-	-
		S1.c	0	213	-	-	-
		S1.d	0	109	-	-	-
		S2.a	0	219	-	-	-
		S2.b	0	193	-	-	-
		S2.c	0	89	-	-	-
		S2.d	0	373	-	-	-
80 días	02/07/2019	S1.a	0	-	I	-	I
		S1.b	0	-	I	-	I
		S1.c	0	-	I	-	I
		S1.d	0	-	I	-	I
		S2.a	0	-	I	-	I
		S2.b	0	-	I	-	I
		S2.c	0	-	I	-	I
		S2.d	0	-	I	-	I
Disposición final	20/07/2019	S1	0	-	4	-	-
		S2	0	-	8	-	-
		S3	0	-	-	-	219

I: el número de colonias indeterminado por masificación, pero se verifica la presencia de *Pseudomonas*.

-: no se realizó el cultivo en esa dilución.

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

Control de presencia bacteriana a los 20 primeros días en diluciones 10^{-3} y 10^{-5} fue favorable ya que no se pudo realizar el conteo de UFC por la masificación de la bacteria, verificando la presencia de *Pseudomonas* y gracias a la presencia de carbohidratos en el agar DPI, específico para aislamiento de *Pseudomonas*, se evidenció la producción de ácidos y pigmentos verdes fluorescentes después de 48 horas de incubación a 35°C (**Figura 7-3**).



Figura 7-3. Control de presencia de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas sp* del suelo estéril a los 20 días.

Realizado por: Edwin Licta, 2019.

A los 40 días de la bioaumentación en el suelo nativo estéril con la bacteria *Pseudomonas sp* (**Figura 8-3**) y *Pseudomonas aeruginosa* (**Figura 9-3**) las UFC se mantienen con un alto número de colonias ya que al realizar la dilución 10^{-3} para los 8 cubetos de tratamiento no se puede realizar el conteo, pero esencialmente se verifica la presencia de la bacteria.



Figura 8-3. Presencia de *Pseudomonas sp*(S2) en los cubetos a los 40 días de tratamiento.

Realizado por: Edwin Licta, 2019.

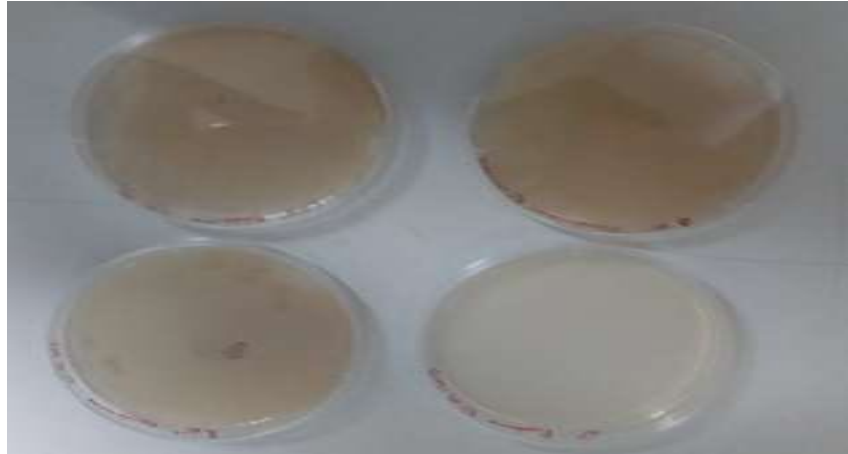


Figura 9-3. Presencia de *Pseudomonas aeruginosa* (S1) en los cubetos a los 40 días de tratamiento.

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

Al cabo de los 60 días se notó un déficit en las UFC en dilución 10^{-1} de los 8 cubetos del tratamiento, por lo que se procedió a realizar un conteo en algunos casos seccionándolo encuadrantes, obteniendo entre 89 a 373 UFC por caja petri (**Figura 10-3**), por lo que se procedió a realizar la activación de las bacterias en criogenia y su la masificación en caldo BHI (**Figura 11-3**), la cual es necesario una nueva bioaumentación del suelo con las bacterias investigadas así sin afectar el análisis de la degradación de la TPHs.

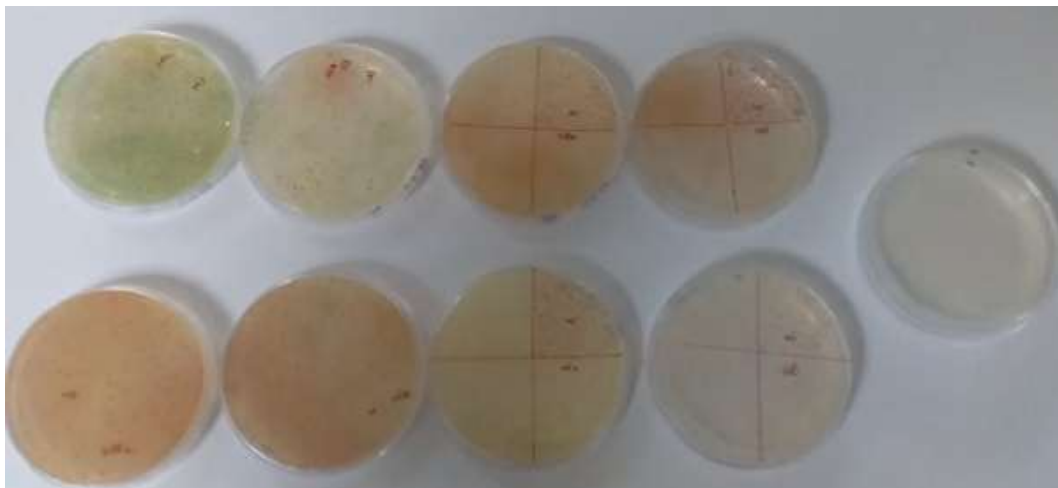


Figura 10-3. Presencia de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas* sp del suelo nativo estéril a los 60 días de tratamiento.

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

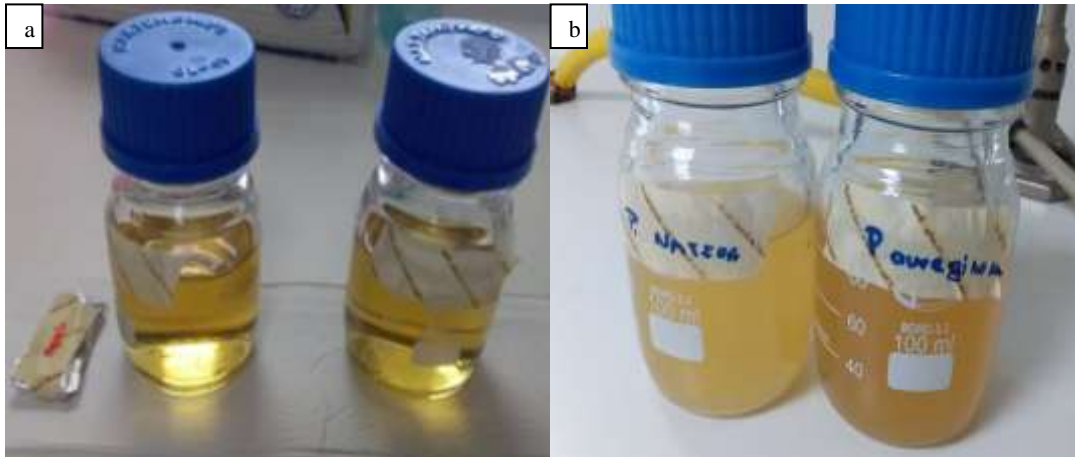


Figura 11-3.(a) Caldo BHI esterilizado *Pseudomonassp* y *Pseudomonas aeruginosa*;(b) Masificación de la bacteria comercial y autóctona para la bioaumentación

Realizado por: Edwin Licta, 2019.

Al termino de los 80 días se cumplió con satisfacción la degradación de TPHs, gracias al control se verifico de la presencia de las bacterias en las muestrasde suelo, diluidas en 10^{-3} y 10^{-8} (**Figura 12-3**), donde no se puede realizar el conteo de las UFC por loque es necesario reducir la carga microbiana sometiendo a condiciones extremas de temperatura superior a 50°C al suelo en tratamiento, para su posterior verificación de las UFC teniendo como resultado 4 UFC por caja petri en dilución 10^{-5} (**Figura 13-3**), después de 24 horas de incubación a 35°C .



Figura12-3.Control de la presencia bacterianaen los cubetos S1(a, b, c, d), S2 (a, b, c, d) a los80 días incubada a 35°C por 24 horas.

Realizado por: Edwin Licta, 2019.



Figura13-3.Disminución de la carga microbianapara la disposición final de *Pseudomonas* a los cubetos S1, S2 a los 80 días incubada a 35° C por 24 horas.

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

3.4. Eficiencia

Con las fórmulas planteadas se calculó la eficiencia de degradación, permitiendo dar continuidad al análisis estadístico y de esta manera comprobar la hipótesis planteada en el inicio del estudio. Se obtuvo como resultado que el tratamiento con la bacteria *Pseudomonas* sp (S2) obtuvo un porcentaje de degradación del 89% en comparación a la *Pseudomonas aeruginosa*(S1) que alcanza un 79%, teniendo un rango de amplitud de una con la otra del 10% (Gráfico 8-3) cuyo promedio es una biodegradación del 84%. Además, tenemos la biodegradación realizada para el laboratorio del total del suelo denominada muestra patrón bioaumentado con *Pseudomonas* sp que al cabo de 100 días redujo en un 96 % los TPHs (Gráfico 9-3), tiempo que se alargó por necesidad del laboratorio auspiciante de que el suelo cumpla los límites permisibles del RAOHE 1215.

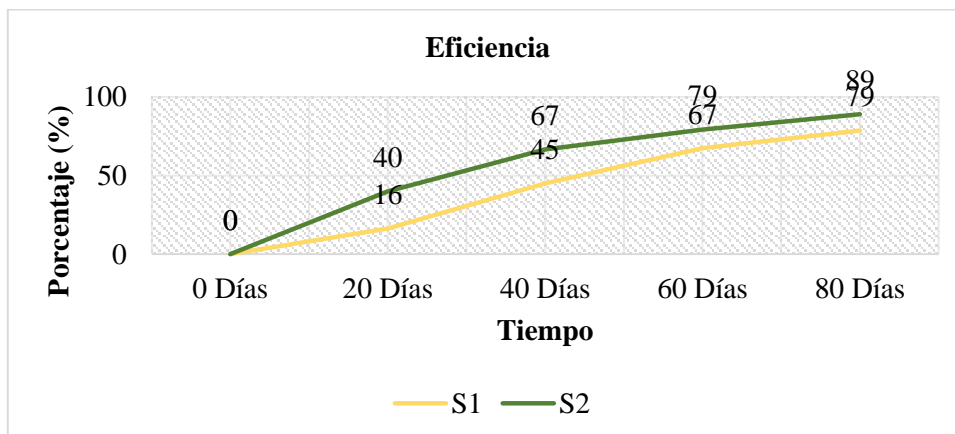


Gráfico 8-3. Crecimiento deeficiencia al degradar TPHsde las bacterias*P. aeruginosa* (S1) y *Pseudomonas* sp (S2) en suelo nativo estéril durante los 80 días de tratamiento.

Realizado por: Edwin Licata, 2019

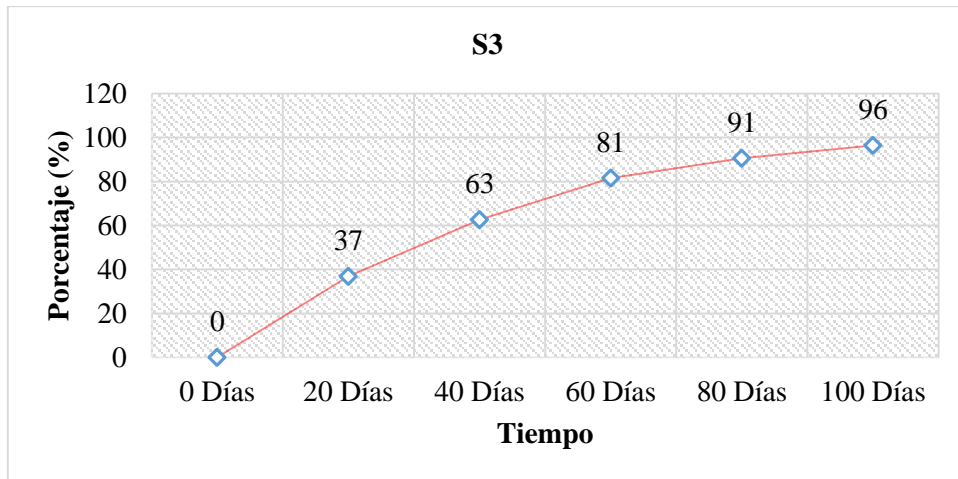


Gráfico 9-3. Eficiencia al degradar TPHs de la bacteria *Pseudomonas* sp. en suelo nativo no estéril durante los 100 días de tratamiento.

Realizado por: Edwin Licata, 2019

3.5. Comprobación de hipótesis

Para la comprobación de la hipótesis fue necesario plantearse los criterios de toma de decisión para aceptar o rechazar cualquier hipótesis, el nivel de significancia, los estadísticos de prueba y la región de rechazo, fundamentales para tomar la decisión adecuada (**Tabla 8-3**).

Tabla 8-3: Criterios estadísticos para toma de decisión.

Planteamiento de Hipótesis		$H_0: \mu S1 = \mu S2$ $H_1: \mu S1 \neq \mu S2$
Nivel de significancia		$\alpha = 0,05$
Estadísticos de prueba	Prueba Kolmogorov-Smirnov y Prueba de Shapiro-Wilk.	Análisis de varianza estadístico ANOVA, la Prueba de TUKEY
Región de rechazo	$Valor p \geq \alpha$ Rechazar la Hipótesis Nula	$Valor p < \alpha$ Rechazar la Hipótesis Nula

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

3.5.1. Pruebas de estadísticos descriptivos

Los estadísticos descriptivos realizados en el software IBM SPSS, nos muestra la población N igual a 5 de todo el tratamiento, es decir el número de análisis de TPHs realizados para proseguir con los estadísticos de prueba si es factible con estos datos continuar con los cálculos estadísticos (**Tabla 9-3**).

Tabla 9-3: Datos estadísticos descriptivos del análisis de TPHs biodegrado.

	Estadísticos descriptivos							
	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media	Desviación	Varianza	
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Desv. Error	Estadístico	Estadístico
TPHs S2.a	5	7304	2062	9366	5582,800	1409,581	3151,918	9934589,700
TPHsS2.b	5	7379	1987	9366	5331,200	1403,179	3137,603	9844552,700
TPHs S2.c	5	7320	2046	9366	5563,200	1357,868	3036,285	9219026,700
TPHs S2.d	5	7476	1890	9366	5439,200	1412,352	3158,115	9973688,700
TPHs S1.a	5	7890	1087	8977	4169,400	1441,664	3223,658	10391969,300
TPHs S1.b	5	7987	990	8977	4189,000	1499,483	3352,945	11242241,000
TPHs S1.c	5	8015	962	8977	3982,400	1411,200	3155,539	9957426,300
TPHs S1.d	5	8042	935	8977	3833,600	1431,882	3201,785	10251427,300
N válido (por lista)	5							

Realizado por: Edwin Licta, 2019.

Los rangos estadísticos obtenidos fueron el mínimo y el máximo valor analizado, la media de los cubetos la desviación estándar (σ) y la varianza (σ^2), para así tener un rango de cuál es la fluctuación o la amplitud que tuvo los TPHs por cada cubeto

3.5.2. Normalidad

No se toma en cuenta el estadístico de prueba Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors ya que presenta un nivel de significancia mayor a el valor de $p > 0,05$, por lo que con este método se trabaja si $p \leq 0,05$. De acuerdo con la prueba de Shapiro-Wilk, se observa que los datos se distribuyen normalmente para la variable bacterias (Autóctona y Comercial) cuyos datos estadísticos van desde 0,189 hasta 0,912; siendo el valor de $p > 0.05$ (**Tabla 10-3**).

Tabla 10-3: Datos Estadísticos de la Prueba de Normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk.

Bacteria	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
TPHs 20 Días	Autóctona	0,274	4	0,893	4	0,395
	Comercial	0,144	4	0,996	4	0,988
TPHs 40 Días	Autóctona	0,275	4	0,838	4	0,189
	Comercial	0,182	4	0,982	4	0,914
TPHs 60 Días	Autóctona	0,292	4	0,931	4	0,601
	Comercial	0,279	4	0,882	4	0,345
TPHs 80 Días	Autóctona	0,271	4	0,904	4	0,452
	Comercial	0,239	4	0,902	4	0,441

a. Corrección de significación de Lilliefors

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

De acuerdo con los resultados de la **Tabla 10-3**, se puede decir que en todos los casos los datos siguen una distribución normal, esto debido a que el p-valor fue mayor a 0,05 y con un nivel de confianza del 95% teniendo evidencia estadística para tomar la decisión de rechazar la hipótesis de normalidad nula. Por ende, se acepta la hipótesis alternativa donde se puede afirmar que las bacterias tienen distinta capacidad de biodegradación de TPHs mediante la bioaumentación, cuando son sometidas a las mismas condiciones físico-químicas ($H_1: \mu S1 \neq \mu S2$).

El gráfico cuantil-cuantil Q-Q normal respalda la conclusión anterior (**Gráfico 10-3; 11-3; 12-3; 13-3**), ya que los valores observados no se sitúan sobre la recta esperada bajo el supuesto de normalidad. Este contraste se realiza para comprobar si se verifica la hipótesis de normalidad necesaria para que el resultado de algunos análisis sea fiable como se detalla en los resultados de la tabla de ANOVA.

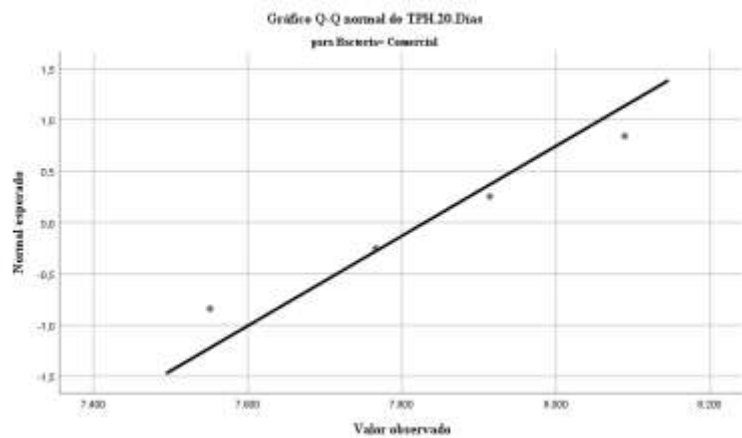
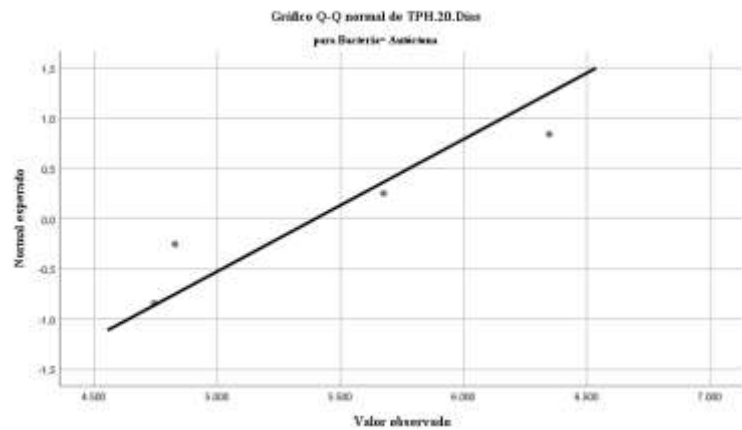


Gráfico10-3: Q-Q normales TPHs 20 días para la bacteria autóctona y comercial

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

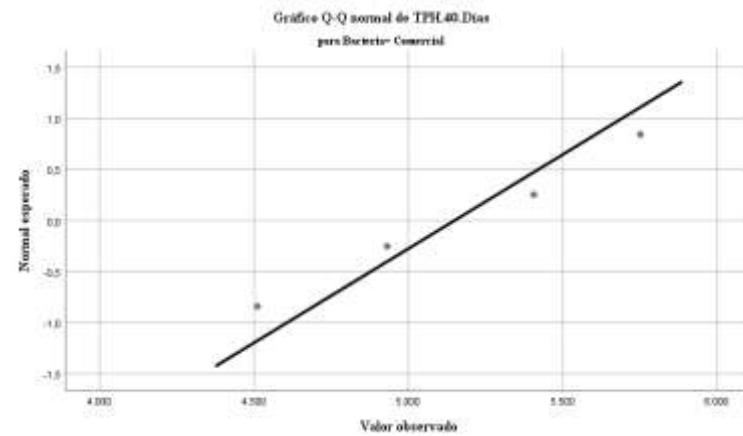
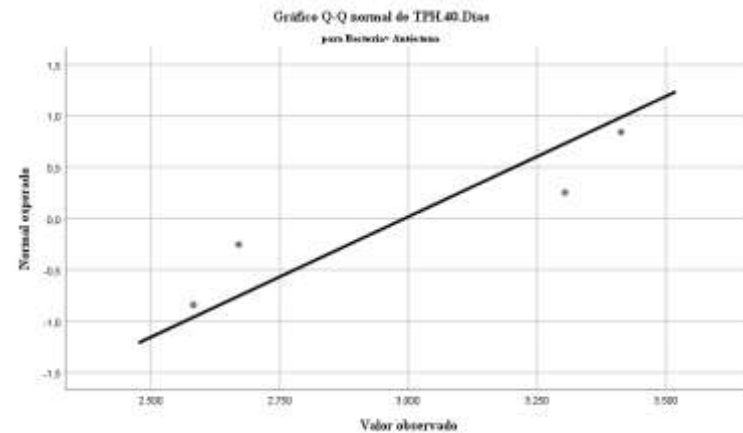


Gráfico 11-3:Q-Q normales TPHs 40 días para la bacteria autóctona y comercial

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

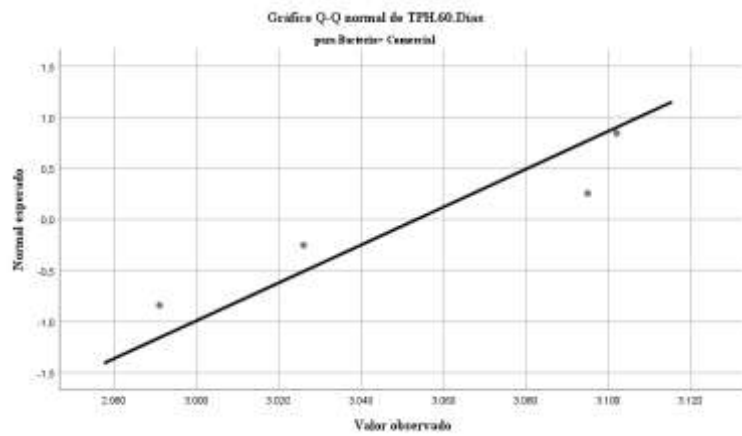
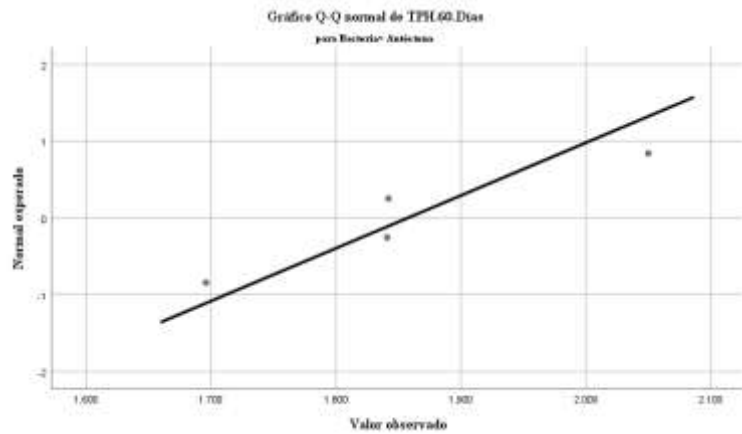


Gráfico 12-3:Q-Q normales TPHs 60 días para la bacteria autóctona y comercial

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

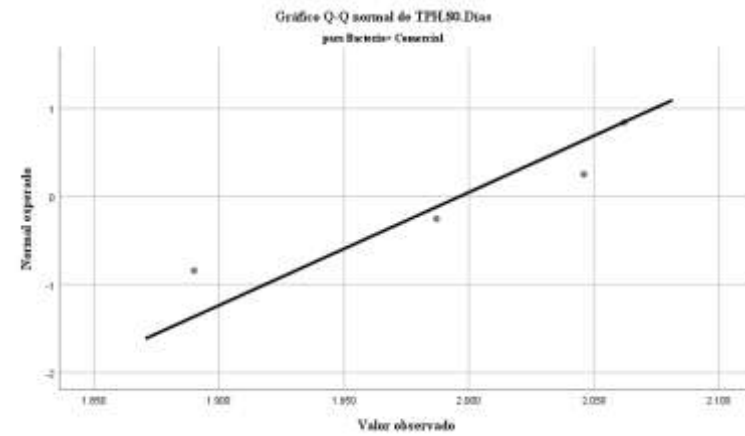
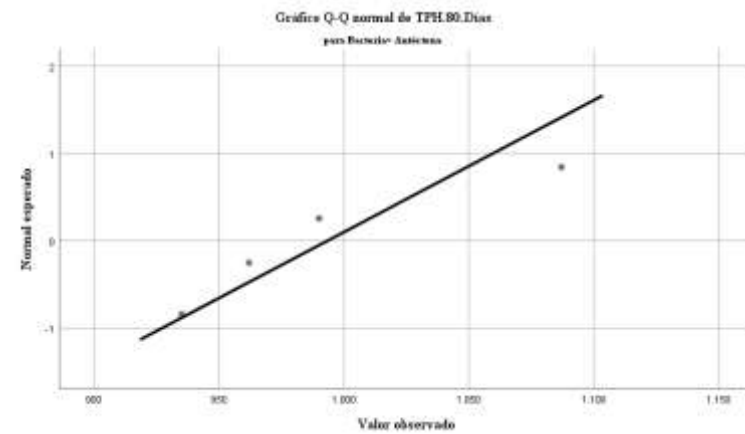


Gráfico 13-3:Q-Q normales TPHs 80 días para la bacteria autóctona y comercial

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

3.5.3. ANOVA análisis de varianza

Con el análisis de varianza estadístico ANOVA, asumiendo varianzas iguales mediante la prueba de TUKEY, comparamos varios grupos en una variable cuantitativa en este caso los TPHs biodegradados medidos en mg/kg de muestra. Por ello, se hizo los diseños para ejecutar la Prueba Tparados muestras independientes. Cuyos resultados se los muestra en la **Tabla 11-3** donde la significancia es menor a 0,05 validando esta prueba.

Tabla 11-3: Datos estadísticos del análisis de varianza ANOVA.

		ANOVA				
		*Suma de cuadrados	gl	*Media cuadrática	F	Sig.
TPHs 80 Días	Entre grupos	2011015,125	1	2011015,125	384,985	0,000
	Dentro de grupos	31341,750	6	5223,625		
	Total	2042356,875	7			
TPHs 60 Días	Entre grupos	2862028,125	1	2862028,125	237,225	0,000
	Dentro de grupos	72387,750	6	12064,625		
	Total	2934415,875	7			
TPHs 40 Días	Entre grupos	9309612,500	1	9309612,500	39,078	0,001
	Dentro de grupos	1429387,500	6	238231,250		
	Total	10739000,000	7			
TPHs 20 Días	Entre grupos	11829248,000	1	11829248,000	37,681	0,001
	Dentro de grupos	1883570,000	6	313928,333		
	Total	13712818,000	7			

*Suma de Cuadrados y media cuadrática se expresa en mg/kg de muestra

-gl: Grados de libertad; F: Distribución F es una continua probabilidad de distribución.

Realizado por: Edwin Licata, 2019.

De acuerdo con los resultados de la **Tabla 11-3**, se puede decir que debido a que el p-valor fue menor a 0,05. En consecuencia, se verifica que los datos estadísticos están correctos en la prueba de normalidad la cual permitió rechazar la hipótesis de normalidad nula y aceptar la hipótesis alternativa ya que las bacterias tienen distinta capacidad de biodegradación de TPHs mediante la bioaumentación, cuando son sometidas a las mismas condiciones físico-químicas donde la bacteria más eficiente para la biodegradación de TPHs es la *Pseudomonas* sp autóctona.

Las pruebas de normalidad se evidencian que los datos no se distribuyen de manera normal corroborando que hay diferencias entre los tratamientos. Por ello la prueba T de Student correlaciona muestras emparejadas que permitió conocer la diferencia significativa de los tratamientos entre sí y cuál de las muestras emparejadas tiene menor o mayor correlación en función del tiempo.

CONCLUSIONES

- La bioaumentación con bacterias autóctonas aisladas y masificadas pertenecientes a la familia Pseudomonadaceae, específicamente el género *Pseudomonas*, redujo la concentración de hidrocarburos totales de petróleo (TPHs) iniciales en suelos contaminados hasta un porcentaje final del 4 -12%. Estos resultados muestran una eficiencia en comparación a la tasa de biodegradación de la bacteria comercial *Pseudomonas aeruginosa* que mostró una concentración final del 20 al 22% de TPHs en los aglomerados o pasivos ambientales almacenados en el laboratorio AqLab que se usaron en esta investigación.
- La determinación de las condiciones físico-químicas del suelo contaminado antes, durante y después del tratamiento es esencial para la verificación de estado inicial del mismo. Los resultados obtenidos muestran que las condiciones de calidad del suelo presentan niveles bajos de nutrientes y minerales para el óptimo desarrollo de plantas, con excepción del fósforo que inicialmente se encuentra en una alta concentración en el suelo. Sin embargo, el suelo tratado muestra una clara mejora en cuanto a su calidad, lo que sugiere que estos pasivos ambientales podrían ser reintegrados a zonas de operación hidrocarburífera una vez finalizado el tratamiento y habiendo reducido las concentraciones de TPHs a límites permisibles del Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas.
- *Pseudomonas* spp. mostró una eficiencia promedio igual al 89 % y *Pseudomonas aeruginosa* una eficiencia promedio de 79%, tras comparar los niveles de TPHs iniciales y finales, comprobando la superioridad de la bacteria autóctona frente a la bacteria comercial. Además, la biorremediación de la muestra patrón general, mediante la bioaumentación de la bacteria autóctona *Pseudomonas* spp., logró reducir un 96 % de TPHs, permitiendo que los suelos tratados cumplan el límite permisible dispuesto por las normativas locales.
- El empleo de bacterias autóctonas de la zona es determinante para asegurar una acelerada y eficiente biodegradación debido a la adaptabilidad innata que tienen estas cepas frente a otras que no son nativas del sitio a remediar. Por ello, un claro ejemplo de eficiencia bacteriana se dio en el suelo patrón al no esterilizar el suelo, esto al tener consorcios bacterianos que actúan de mejor manera a la hora de biorremediar suelos contaminados.

RECOMENDACIONES

- En cuanto a la parte microbiológica tomar precauciones como en el caso de los medios de cultivo son solamente para uso profesional o técnico de laboratorio capacitado, no utilizar las placas Petri si muestran alguna evidencia de contaminación microbiana. Consultar los procedimientos de manipulación aséptica, riesgos biológicos y desecho del producto usado como en el caso del riego bilógico al momento de activar la bacteria comercial.
- Para el control de variables dentro del tratamiento, realizarlo en periodos más frecuentes para mantener las condiciones óptimas de crecimiento como es el caso de la irrigación ya que las condiciones ambientales de la zona favorecen a la evaporación del agua produciendo una reducción en la humedad del suelo afectando al desplazamiento de las bacterias entre las partículas del suelo.
- Por otro lado aumentar el control de Temperatura a 3 datos mínimos por día a temperatura ambiente y en función de la cantidad de bacterias para realizar la fases de crecimiento bacteriano, teniendo mejor precisión en el comportamiento del bacteria a temperatura ambiente y no realizar el tratamiento en un invernadero cuyos costos de operación a nivel comercial en las industrias hidrocarburíferas son limitantes para la aplicación a grandes cantidades de suelo por lo que este tipo de investigaciones son más con fines aplicativos en laboratorios especializados mas no en el campo de operación de las industrias hidrocarburíferas.
- En cuanto a las propiedades químicas del suelo para aumentar la fertilidad del es recomendable la adición de sustratos y aditivos naturales como bagazos de caña,etc. Específicamente fuentes ricas en nutrientes y minerales, solo para dar la disposición final del suelo tratado mas no en el transcurso del tratamiento ya que las bacterias asimilaran estas fuentes de energía y carbono, pudiendo no degradara el contaminante en este caso los TPHs.

BIBLIOGRAFÍA

AGRAWAL, T. Genotypic and phenotypic diversity of polyhydroxybutyrate (PHB) producing *Pseudomonas putida* isolates of Chhattisgarh region and assessment of its phosphate solubilizing ability. 2015. Vol. 5, 1, pp. 45-60.

AGUDELO, E. A. & CARDONA, S. *Análisis preliminar del tratamiento físicoquímico y biológico del aceite dieléctrico presente en tierra Fuller.* Medellín, Colombia: Dyna., 2001. pp. 193-202.

ALBAIGÉS, J. & ALBRECHT, P. Fingerprinting marine pollutant hydrocarbons by computerized gas chromatography mass spectrometry. : Intern J. Environ. Anal. Chem., 1979. Vol. 6, pp. 171-190.

ALCALDIA DE ORELLANA. www.orellana.gob.ec. [En línea] Datos del cantón , 2019. [Citado el: 12 de Agosto de 2019.] <https://www.orellana.gob.ec/es/canton/datos-del-canton>.

ALEXANDER, M. *Biodegradation and Bioremediation.* San Diego : Acad. Quest. , 1994. p. 302.

ALEXIEVA, Z., et al. *Monitoring of aromatic pollutants biodegradation.* 2008. pp. 233-240.

ALLEN, R.G., et al. Crop crop water evapotranspiration. requirements. Guidelines of computing crop water requirements. *nage paper.* Rome : FAO, 2000. Vol. 56, p. 329 .

ALMEIDA, A. & PROAÑO, J. *Tigre, águila y waorani, una sola selva, una sola lucha. Deuda Ecológica de las transnacionales petroleras con el Pueblo Waorani y el Parque Nacional Yasuni.* Quito : Accion Ecologica, 2008.

AMEREX . 2019. www.labamerex.com. [En línea] Laboratorios Amerex Argentina, 2019. [Citado el: 1 de noviembre de 2019.] <http://www.labamerex.com/novedad019.htm>.

ANDERSON, J.M. & INGRAM, J.S.I. *Tropical Soil Biology and Fertility - A Handbook of Methods.* Wallingford, Oxon, UK : C.A.B. International, 1993.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.* 5° Washington, D.C., 2015.

AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA) & WORLD ECONOMIC FORUM(WEF). Standard Methodos For examination of Water and Wastewater. 23 [ed.] Baird Rodger, Eaton Andrew y Rice. Eugene. Whashington, DC, EE.UU : American Public Health Association 800 i Street, NW, 5 de Octubre de 2017. Vol. 21, 69400, págs. 94-97. ISBN987-087553-287-5/ISSN 55-1979.

ARORA, M. & OLIVEIRA, E. *Plant Microbes Symbiosis*. Plant Facets. India : Springer. W., 2015.

ATLAS, R.M. & BARTHA, R. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Addison Wesley, 2001. Vol. 4.

ATLAS, et al. Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4º ed. Addison Wesley, 2001.

AGENCIA DE SUSTANCIAS TOXICAS Y REGISTRO DE ENFERMEDADES (ATSDR).*Reseza Toxicológica de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs)*. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública. Atlanta, 1998.

BACTERIO LÓGICO. Bacterias fluorescentes. Pseudomonas aeruginosa en agar sangre, bajo una luz Uv. [ed.] @ProfBacterio2. 20 de Diciembre de 2016.

BECERRA, S., et al. *Vivir con la Contaminación Petrolera en el Ecuador: Percepciones Sociales del Riesgo Sanitario y Capacidad de Respuesta*. Quito : R. Lider, 2013. pp. 102-120. ISSN: 0717-0165.

BENAVIDES, L. J.& OSTOS, O. Aislamiento e identificación de diez Bacterias desnitrificantes a partir de un suelo Agrícola contaminado con abonos nitrogenados proveniente de una finca productora de cebolla Nova-Publicación Científica, 2006. Vol. 4, 6, pp. 50-54.

BERISTAIN, M.& FERNANDEZ, I. *Las palabras de la selva : Estudio psicosocial del impacto de las explotaciones petroleras de Texaco en las comunidades amazónicas de Ecuador*. Bilbao : Hegoa., 2009. p. 232.

BISSARDON, P., et al.*Le risque sanitaire lie aux activités pétrolières en Amazonie Equatorienne : des alertes aux décisions*. Ecuador : Environ. Risq. S., 2013. pp. 338-344.

BOTELLO, A., et al. Contaminación e impacto ambiental: Características, Composición y Propiedades fisicoquímicas del petróleo. 2 Golfo de México : Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología., 2005. p. 696. ISBN 968-5722-37-4.

BRADY, N. C. The Nature and properties of soils. Macmillan Pub., 1984.

BRENNER, D.J., et al. Classification of prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. 2º [ed.] Castenholz R. W., Garrity G.M. Boone D.R. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York : Springer-Verlag., 2001. Vol. 2, pp. 27-31.

BROOKS, GEO F., et al. Microbiología médica Derecho , Derechos Reservados. s.l. : McGraw-Hill Education, 2013. Vol. 26.

BUDZINSKI, H., et al. Aerobic biodegradation of alkylated aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *Org. Geochem.*, 1998. Vol. 28, pp. 337-348.

BUSTAMANTE, T. & JARRÍN, C. Indicadores sociales y petróleo en la Amazonia". En: La cortina de humo, dinámicas sociales y petróleo en Ecuador. Quito : FLASCO, 2007. pp. 21-95.

CASELLAS, M., et al. Isolation and characterization of a 9-fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. *Can. J. Microbiol.*, 1998. Vol. 44, pp. 734-742.

CEDILLO, G. S. *Aplicación de la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, mediante bioaugmentación y bioestimulación de cepas bacterianas autóctonas*. [ed.] Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala, 2013.

CHAVAS, J. "Ecosystem valuation under uncertainty & irreversibility". [Online] 2000.

CLARCK, R.C. & BROWN, D. W. Petroleum, properties and analyses in biotic systems. Academic Press. [ed.] D.C. Malins. *Effects of Petroleum on Arctic and Subarctic Marine Environments and Organisms*. New York, 1977. Vol. 1, pp. 1-89.

DE VOS, P., et al. Genotypic relationships and taxonomic localization of unclassified *Pseudomonas* and *Pseudomonas*-like strains by deoxy-ribonucleic acid: Ribosomal ribonucleic acid hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1989. Vol. 9, pp. 35-49.

DON-KIRKHAM. Advanced Soil Physics. John Wiley & Sons, 1972.

DSPACE. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/>. [En línea] Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2019. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/>.

ECHEVERRI, G., et al. *Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en ecosistemas costeros de Colombia.* Bahía de Cartagena : Ciencias Biomédicas, 2011. p. 11. ISSN:1794-2470.

EDEL, W. & KAMPELMACHER, E. H. Edel Comparative studies on the isolation of “sublethally injured” salmonellae in nine European laboratories. Bull. WHO, 1973. Vol. 48, pp. 167-174.

EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES AND HEALTHCARE (EDQMH). Microbiological examination of herbal medicinal products for oral use and extracts used in their preparation. 8th [ed.] European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare. Strasbourg , France :, 2001. p. Chapter 2.6.31.

EL COMERCIO. <https://www.elcomercio.com>. 2018.

EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY (EEA). “Late lessons from early warnings: the precautionary principle 1896–2000”,. Copenhagen. : Environmental Issue Report , 2001. Vol. 22.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) and BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL (BAM). Cronobacter. EE.UU. : Food and Drug Administration – Bacteriological Analytical Manual., 2012. 29.

FISHER, M.C., et al. Sncakers as a source of *Pseudomonas aeruginosa* in children with osteomyelitis following puncture wounds. J. Pediatr., 1985. Vol. 106, pp. 607-609.

FOGHT, J. M., et al. Development of a standard bacterial consortium for laboratory efficacy testing of commercial freshwater oil spill bioremediation agents. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 1998. Vol. 21, pp. 322-330.

GARCÍA-RIVERO, M. & PERALTA-PÉREZ, M. R. COMETABOLISMO EN LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS. *AMIDIQ.* México : Revista Mexicana de Ingeniería Química, 2008. Vol. 7, 1, pp. 1-12.

GONZALES, B. et al. Biodegradación de hidrocarburos por microorganismos aislados de un lodo aceitoso. Mexico : I. Mexi. P., 2014. Vol. 152, 117, p. 1.

GURROLA, B.A. Tratamiento de un suelo de la industria minera contaminado con hidrocarburos, empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes: Biorremediación a nivel piloto. Durango, 2008. p. 151.

HARITASH, A.K. & KAUSHIK, C.P. *Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)*: 2009. pp. 1-15.

HERNÁNDEZ, STEGMANN, et al. Fisiología de las glándulas tiroideas y paratiroides. Barcelona , 2017.

HERNDON, J. & WHITESIDE, M. Más evidencias de que la contaminación por partículas es la principal causa del calentamiento global: consideraciones humanitarias. J. of Geography, Environment and Earth Science, 2019. Vol. 21, 1. 2454-7352.

HOLLAND, S.P., et al. *Pseudomonas aeruginosa* ocular infections. [ed.] R.B. Fick. *Pseudomonas aeruginosa the opportunist*. Press. Inc. Boca Roton Fla., 1993. pp. 159-176.

HUESEMANN, M. *Guidelines for land-treating petroleum hydrocarbon-contaminated soils*. Boston : Jew. Soc. Cont., 1994. pp. 299 - 318.

HURTIG, AK. *Incidence of childhood leukemia and oil exploitation in the Amazon basin of Ecuador*. Ecuador : Int. J., 2004. pp. 245-250.

IAÑEZ-PAREJA, E. Acción de los Agentes Físicos Sobre las Bacterias. [ed.] Universidad Nacional del Nordeste. Chaco, Argentina : HIPERTEXTOS DEL ÁREA DE LA BIOLOGÍA, 06 de Agosto de 1998.

JOCHNICK, C. *Violaciones de derechos en la Amazonía Ecuatoriana. Las consecuencias humanas del Desarrollo Petrolero*. Quito, Ecuador : Edil. Cers., 1994.

JUTEAU, G. *Explotación petrolera en ecuador: en busca de una Nuevo modelo de desarrollo, entre problemas económicos y conflictos. socioambiental.* Quito, Ecuador, 2012. pp. 1-15.

JUWARKAR, A, et al. Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. *Chemosphere*, 2007. Vol. 68, pp. 1996-2002.

KAO, C.M., et al. Application of microbial enumeration technique to evaluate the occurrence of natural bioremediation. *Water Res.*, 2001, Vol. 35, pp. 1951-60.

KING, E.O., et al. Composición teórica del medio de cultivo King B. *J. Lab. Clin. Méd.*, 1954. Vol. 44, p. 301.

KOMUKAI-NAKAMURA, S., et al. Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude. *J. Ferm. Bioeng.*, 1996. Vol. 82, pp. 570-574.

KUMAR, G. P., et al. *Isolation of fluorescent Pseudomonas spp. from diverse agro-ecosystems of India and characterization of their PGPR traits.* 2015. pp. 13-24.

LOERA, P., et al. *Biodegradación de compuestos aromáticos.* 2016. pp. 1-13. ISSN 2334-2501.

LOVLEY, D. R. & COATES, J. D. Bioremediation of metal contamination. : Current Opinion in Microbiology, 1997. Vol. 8, pp. 285-289.

MALAGÓN, H. & MONTENEGRO, D. Propiedades Físicas de los Suelos. A. Codazzi : Intituto Geográfico A. Codazzi, 1990.

MALDONADO, A. & NARVÁEZ, A. Ecuador ni es, ni será ya, país amazónico. Inventario de impactos petroleros. Quito : Acc. Ecol., 2003, Vol. 1.

MARTINEZ, A. & RUSSI, D. Los Pasivos Ambientales. Enero 2013, Vol. 1, pp. 123-131.

MENÉNDEZ, D., et al. *Engineered in situ bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons.* Engineered in situ bioremediation. Madrid : J. Soi. Biol., 2007. pp. 310-321.

MEYER, J.M., et al. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of florescent and nonfluorescent *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol*, 2002. Vol. 68, pp. 2745-2753.

MIGULA, W. Ueber ein neues System der Baktereien. Alemania : Arb. Bakteriolog. Inst. Technisch. Hochsch. Karlsruhe, 1985. Vol. 1, pp. 235-238.

MONTOYA, J. C., et al. *Efectos ambientales y socioeconómicos por el derrame de petróleo en el río Desaguadero*. La Paz : PIEB, 2002. p. 222. 99905-68-03-0.

MORRISON, A.J. & WENZEL, R.P. Epidemiology infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Infwct. Dis., 1984. Vol. 3, pp. 627-642.

MUNDA, G. & O'NEILL, J. "Weak comparability of values as a foundation for ecological economics". [Online] 1998.

NARVÁEZ, S., et al. *Selección de bacterias con capacidad de degradación de hidrocarburos a partir de sedimentos del Caribe colombiano*. 2008. pp. 61-75. ISSN 0122-9761.

O'CONNOR, M. "Ecological and economic distribution conflicts". [ed.] Island Press. en: *Costanza R., O. Segura y J. Martínez – Alier, (ed.), Getting down to earth: practical application of Ecological Economics*. 1996.

ORTA, M., et al. *Impacts of petroleum activities for the Achuar people of the Peruvian Amazon: summary of existing evidence and research gaps*. Perú : Environ. Res. Lett., 2007.

PALLERONI, N.J. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. [ed.] N. R. Kreig y J. G. Holt. *Genus I. Pseudomonas*. Baltimore M.A., EE.UU. : Williams and Wilkins, 1984. págs. 141-199.

PALLERONI, N.J. *Genus I. Pseudomonas*. Kreig, N.R.; Holt, J. G. [ed.] N.R. Kreig y J. G. Holt. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore MA, EE.UU. : Williams And Wilkins, 1984. págs. 141-199.

PALLERONI, N.J. Present situation of the taxonomy of aerobic *Pseudomonas*. [ed.] S. Silver y B. Witholt E. Galli. *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*,. Washington, DC : ASM Press., 1992. pp. 105-115.

PALLERONI, N.J. *Pseudomonas*. [ed.] D. J. Brenner, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York : Springer-Verlag., 2005. Vol. 2, pp. 323-379.

PALLERONI, N.J., et al. Nucleic acid Homologies in the genus *Pseudomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol, 1973. Vol. 23, págs. 333-339.

PLASTER, EDWARD J. *La ciencia del suelo y su manejo*. Ed. Paraninfo, 2000.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. [ed.] G.L. Mandell, J.E. Bennett y R. Dolin. *Principales and Practice of Infections Diseases*. 2000. págs. 1980-2003.

PORTA, J., et al. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. 3º ed. Madrid : Mundi-Prensa, 2003.

POSTHUMA, J. The composition of petroleum. Rapp. P.V. Reun. Cons. It. Explor. Mer., 1977. Vol. 171, págs. 7-16.

RAJENDRAN, P., et al. Microbes in heavy metal remediation. Indian J. of Experimental B., 2003. Vol. 41, pp. 935-944.

ROBERTS, R. Remediation of petroleum contaminated soils. 1998. p. 28.

ROCKNE, K., et al. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate reducing conditions. Applied and Environmental Microbiology, 2000. Vol. 66, 4, pp. 1595-1601.

SABATÉ, J., et al. Laboratory-scale biorremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soil. Laboratory of biorremediation. Sci. Direc. Elsevier B.V., 2004. pp. 19- 25.

SACHERER, P., et al. Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulator gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. FEMS Microbiology Letters, 1994. Vol. 116, págs. 155–160.

SALINAS, A., et al. Development of a bioremediation process by biostimulation of native microbial consortium through the heap leaching technique. J. Environ. Mang., 2007. pp. 115-119.

SAN_SEBASTIAN, M., et al. Exposures and cancer incidence near oil fields in the Amazon basin of Ecuador. Ecuador : Med. Aug., 2001. pp. 517-22.

SAYLER, G. S., et al. Catabolic plasmids of environmental and ecological significance. Microbial Ecology, 1990. Vol. 19, 1, pp. 1-20.

SCHROTH, M., et al. Phytopathogenic *Pseudomonas* and plant-associated *Pseudomonas*. 2 [ed.] H. G. Truper, M. Dworkin, W. Heder, K.H. Schleifer A. Balows. New York : Springer-Verlag, 1992. Vol. 3, pp. 3104-3131.

SHAN, GEN L. Mechanisms of granular activated carbon anaerobic fluidized-bed process for treating phenols wastewater. 2002, Vol. 14, pp. 132-135.

SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. Glossar of soil science terms. . Wisconsin : Madison, 2001. pág. 138.

SUGIURA, K., et al. Physicochemical Properties and Biodegradability of Crude Oil. Environ. Sci. Technol., 1997. Vol. 31, pp. 45-51.

TORTORA_GERARD, J. Introducción a la microbiología. 9ª. Médica Panamericana, 2007.

TROJER, H.The phenological equator for coffee planting in Colombia. First Symposium of Agrometeorology. London. 1966b. p. 19.

UĞUR, A., et al. Characterization of *Pseudomonas* spp. from seawater of the southwest coast of Turkey. Turkey. J. Environ. Stud., 2012. pp. 15-23.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY OF EE. UU. (USEPA).Use of monitored natural attenuation at superfund, RCRA corrective action and underground storage tank sites. . *OSWER Directive Number 9200.4-17P*. Washington, DC : Office of Solid Waste and Emergency Response, 2001.

VAN DER ENT, S., et al. Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and β -aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. *New Phytologist*, 2009. Vol. 183, pp. 419-431.

VAN DEUREN, J., et al.*Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide*. EPA. Technology Innovation Office, 2002.

VARGAS, T. & ALVIN, K. " Morfología bacteriana" Actualización clínica. 2014. Vol. 49, 2, pp. 2594-2598.

VENKATESWARAN, K., et al. Microbial degradation of resins fractionated from Arabian light crude oil. *Can. J. Microbiol.*, 1995. Vol. 41, pp. 418-424.

VIDHYASEKARAN, P. & MUTHAMILAN, M. Evaluation of powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for control of rice sheath blight, *Biocontrol Science and Technology*, 1999. Vol. 9:, pp. 67-74.

VILLARREAL, S.L., et al. Biodegradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos contaminantes del medio ambiente y alimentos. 2014. Vol. 6, 11, pp. 28-39.

VILLATORO, V., et al. *La Biodegradación anaerobia de compuestos aromáticos*. 2002. pp. 7-21.

WATANABE, M. E. Starved bacteria investigated as bioremediation barrier technology. *Environmental Science and Technology*, 2001. Vol. 8, 30, pp. A333-A333.

WHYTE, L.G., et al. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. *Applied and environmental Microbiology*, 1997. Vol. 63, 9, pp. 3719-3723.

WOESE, C.R., et al. The phylogeny of purple bacteria: The gamma subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.*, 1985. Vol. 6, págs. 25-33.

ZAMORA-CARDONA, J. C. & CRISTANCHO, F. *La Humedad en las Propiedades Físicas del Suelo*. Bogotá : Universidad Nacional de Colombia, 2008.

ANEXOS

ANEXO D: DATOS DE LAS VARIABLES CONTROLADAS DURANTE LOS 80 DÍAS DE TRATAMIENTO DEL SUELO

Resultados de los Tiramientos Durante 80 Días												
Análisis	Semanas	S1	S1.a	S1.b	S1.c	S1.d	S2	S2.a	S2.b	S2.c	S2.d	S3
Conductividad Eléctrica Promedio (CE = $\mu\text{S}/\text{cm}$)	1	527	489	435	730	454	478	389	435	690	398	240
	2	538	503	445	738	467	484	388	445	693	408	268
	3	494	549	457	493	478	452	441	451	449	465	289
	4	403	416	386	451	357	343	243	384	384	360	360
	5	440	492	409	439	419	418	380	428	439	425	315
	6	375	395	445	308	350	414	375	419	395	466	254
	7	375	376	315	416	393	361	351	343	429	321	321
	8	322	350	269	318	349	293	277	253	311	331	260
	9	459	492	451	460	432	457	443	464	475	447	280
	10	493	522	476	441	531	442	397	455	480	434	215
	11	609	698	598	597	542	551	521	541	581	562	233
	12	530	513	678	435	494	511	439	597	442	566	208
pH Promedio Semanal	1	7,28	7,36	7,35	7,13	7,27	6,88	7,08	7	6,85	6,6	6,9
	2	7,64	7,73	7,56	7,64	7,61	7,35	7,07	7,2	7,44	7,68	7,85
	3	7,86	7,86	7,88	7,86	7,85	7,14	7,01	7,09	7,17	7,28	7,64
	4	7,55	7,57	7,59	7,54	7,49	7,39	7,56	7,38	7,38	7,24	7,52
	5	7,49	7,65	7,6	7,42	7,3	7,61	7,61	7,6	7,59	7,63	7,45
	6	7,45	7,54	7,4	7,44	7,43	7,16	7,32	7,31	7,31	6,68	6,43
	7	7,31	7,36	7,33	7,24	7,3	7,07	6,79	7,23	7,04	7,22	7,42
	8	6,46	6,27	6,48	6,49	6,61	6,46	6,13	6,47	6,63	6,59	7,15
	9	7,29	7,17	7,38	7,3	7,29	7,16	7,17	7,15	7,15	7,16	7,29
	10	6,31	6,38	6,48	6,27	6,11	6,32	6,39	6,21	6,35	6,33	6,62
	11	7,10	6,71	7,02	7,33	7,33	7,38	7,37	7,39	7,37	7,38	7,6
	12	7,51	7,54	7,48	7,56	7,47	7,44	7,49	7,39	7,47	7,4	7,64
Humedad Promedio Semanal (%)	1	83	84	85	78	85	84	85	83	82	86	73
	2	71	70	70	71	71	69	64	72	72	67	61
	3	73	73	73	73	74	73	72	74	73	73	71
	4	70	68	69	71	71	72	73	71	72	72	57
	5	55	55	55	54	57	58	57	59	57	57	63
	6	63	63	64	62	63	65	65	65	64	65	87
	7	61	61	60	63	58	62	64	60	61	62	62
	8	62	61	60	63	62	63	64	60	64	64	72
	9	64	62	67	64	61	62	63	64	60	61	63
	10	69	67	70	70	69	68	69	71	66	67	68
	11	62	61	62	62	63	68	67	67	67	69	71
	12	62	62	62	61	63	61	61	62	61	61	66

ANEXO E: TEMPERATURA DIARIA DURANTE LOS 80 DÍAS DE TRATAMIENTO DEL SUELO

Días	Fecha	Semana	Suelo Nativo Estéril (P. aeruginosa)				Suelo Nativo Estéril (Pseudomonas sp)				Suelo Nativo No Estéril (Pseudomonas sp)
			S1.a	S1.b	S1.c	S1.d	S2.a	S2.b	S2.c	S2.d	S3
1	29/4/2019	1	31,9	31	31	31	32	32	32	32	31,61
2	30/4/2019		33	33,6	34,1	32,9	33,8	33,5	33,2	33,2	33,41
3	1/5/2019		31,9	31,4	31	31,7	31,7	30,1	31,2	31,5	31,31
4	2/5/2019		31	31	30	31	31,6	31,4	31,5	31,9	31,18
5	3/5/2019		30	31	31	31	31,5	31	31,2	31,2	30,99
Promedio			31,6	31,6	31,4	31,5	32,1	31,6	31,8	32	31,7
6	6/5/2019	2	28,2	28,1	28	27,9	27,9	28,1	28,2	28,2	28,08
7	7/5/2019		32,9	33,4	31,9	31	32,6	33,5	32,6	32,5	32,55
8	8/5/2019		35,8	32,3	35,5	34,1	38,4	39,8	35,4	37,4	36,09
9	9/5/2019		35,1	34,9	33,2	35,7	32,6	35,2	36	35	34,71
10	10/5/2019		40,3	44	38,1	39,3	35,8	41,1	42	43,2	40,48
Promedio			34,5	34,5	33,3	33,6	33,5	35,5	34,8	35,3	34,4
11	13/5/2019	3	27,4	27,2	26,9	27,1	26,5	27	27,7	27,2	26,4
12	14/5/2019		28,2	27,4	27,6	27,3	27,4	27,7	27,8	27,8	27,1
13	15/5/2019		28,5	28,5	28,2	28,5	27,7	28,2	28,8	28,8	27,5
14	16/5/2019		33,8	33,7	32,9	34	32,5	36,7	36,6	34,7	32,4
15	17/5/2019		32,5	33,7	32,8	31,9	33,1	32,4	32,7	32,2	31,7
Promedio			30,1	30,1	29,7	29,8	29,4	30,4	30,7	30,1	29
16	20/5/2019	4	26,9	27	27,1	27,2	29,5	26,4	27	27	26,4
17	21/5/2019		30,2	30	29,6	30,2	29,2	30,1	30,1	31	29,4
18	22/5/2019		35,3	33,9	34,6	35,4	34	36,8	36,3	35,8	33,5
19	23/5/2019		39,9	41,1	41,8	38,2	40,2	40,3	40,9	40,4	38,1
20	24/5/2019		37,7	37,1	38,7	37,3	38,1	37	40,8	37,3	37,1
Promedio			34	33,8	34,4	33,7	34,2	34,1	35	34,3	32,9
21	27/5/2019	5	33,7	34	31	31,9	34,7	32,4	34	33,5	31,1
22	28/5/2019		37,5	38	34,9	31,1	36,5	37,4	39,1	36,4	32,3
23	29/5/2019		36,1	32	36,1	35,2	35,5	35,6	35,4	33,6	32,1
24	30/5/2019		35,1	31,8	33,1	36,4	37,8	35,7	38,2	36,8	31,7
25	31/5/2019		32,8	30,7	33,3	34,2	33,1	32,4	33,6	34,4	32,3
Promedio			35	33,3	33,7	33,8	35,5	34,7	36,1	34,9	31,9
26	3/6/2019	6	30,7	28	30,5	30,4	29,1	29,9	30,4	30,5	28,2
27	4/6/2019		24,3	25,8	24,2	24,9	25,7	26,5	26,1	25,5	24,1
28	5/6/2019		39,3	34,1	33,5	35,9	30,8	35,2	36,1	37,4	30,5
29	6/6/2019		36,9	28,7	30	31,5	35,4	32,7	32	33,2	28,7
30	7/6/2019		29,8	27,4	28,4	33,2	29,3	30,3	29,3	29,6	27,5
Promedio			32,2	28,8	29,3	31,2	30,1	30,9	30,8	31,2	27,8
31	10/6/2019	7	26,9	28,4	27,2	27,5	27,5	28	27,2	28,1	26,7

32	11/6/2019		26,8	27	26,5	26,4	26,8	26,9	26,8	26,9	26,4
33	12/6/2019		28,6	28,6	29,6	28,9	29,4	29,5	29,6	29,7	28,1
34	13/6/2019		27,6	26,3	27,3	26,9	26,8	26	26,6	26,4	26,2
35	14/6/2019		28,1	27,7	28	27,8	27,9	27,5	27,9	28,4	27,5
Promedio			27,6	27,6	27,7	27,5	27,7	27,6	27,6	27,9	27
36	17/6/2019	8	27,3	26,9	27,1	26,9	26,8	27,2	26,9	26,9	26,7
37	18/6/2019		28	30,1	32,6	27,3	28,4	27,6	28,6	28,7	27,2
38	19/6/2019		36	38,3	38,5	40,5	32,3	32,5	33,2	33	31,8
39	20/6/2019		27,4	27,7	26,9	26,1	26,8	26,9	26,9	27,1	26,1
40	21/6/2019		24,7	24,4	25,9	25,3	25,7	24,9	25,3	24,7	24,3
Promedio			28,7	29,5	30,2	29,2	28	27,8	28,2	28,1	27,2
41	24/6/2019	9	29,6	30,3	27,3	29,4	29,4	29,6	29,5	29,8	27,3
42	25/6/2019		34,9	35,1	31,3	32,8	33,5	33,3	34,3	33,5	31,4
43	26/6/2019		28,2	29,8	30,6	31,5	30,2	30,1	30,7	31	28,1
44	27/6/2019		29,3	31,1	29,7	31,3	30,8	30,6	31,1	31,2	29,2
45	28/6/2019		26,8	29,7	27,3	27	27	29,7	28,4	28,5	26,2
Promedio			29,8	31,2	29,24	30,4	30,2	30,7	30,8	30,8	28,44
46	1/7/2019	10	31	32,8	29,5	32,7	31,1	33,1	33,1	33,7	30,9
47	2/7/2019		29,9	29,2	30,4	29,9	31,6	30,8	31,1	32,4	30,4
48	3/7/2019		30,6	31,2	31,7	31,2	32,3	32,6	33	31,8	27,7
49	4/7/2019		28,6	27,6	27,8	28,3	30	28,7	29,1	29	27,9
50	5/7/2019		25,9	26,3	25,5	26,1	26,5	25,8	26,7	26,4	27,8
Promedio			29,2	29,42	28,98	29,64	30,3	30,2	30,6	30,66	28,94
51	8/7/2019	11	26,6	26,3	26	25,8	25,6	25,9	26,3	26,8	24,3
52	9/7/2019		25,6	25,8	25,6	25	26,1	25,8	25,5	26,2	26,1
53	10/7/2019		34,2	32,3	33,8	32,7	35	34,9	34	34,6	30,5
54	11/7/2019		31	29,8	30,5	30,6	31,9	30,9	32,1	31,6	28,3
55	12/7/2019		32,1	31,4	31,1	31,5	32,9	33,1	32,7	33,4	32,6
Promedio			29,9	29,12	29,4	29,12	30,3	30,12	30,12	30,52	28,36
56	15/7/2019	12	31	30,6	30,2	30,3	31,7	31,4	30,7	31,3	27,7
57	16/7/2019		27,9	28,1	28	28	28,6	28,3	28	28,5	28
58	17/7/2019		34,9	35,1	31,3	32,8	33,5	33,3	34,3	33,5	31,4
Promedio			31,3	31,3	29,8	30,4	31,3	31	31	31,1	29

ANEXOF: AVAL DE LA INVESTIGACIÓN DIRIGIDO DE AQLAB DE ESPOCH

CARTA DE AUSPICIO

Pto. Francisco de Orellana, 11 de enero de 2019

Dr. Fausto Yaulema
DIRECTOR DE ESCUELA CIENCIAS QUÍMICAS
ESPOCH

De nuestra consideración

Por la presente, quien suscribe Ing. Armando Meléndrez Lara, en mi calidad de Director Técnico de AQLAB LABORATORIOS ACOSTA Y CIA, nos comprometemos a otorgar el auspicio al Sr. Edwin Geovanny Licta Vega, para que realice el proyecto de Tesis titulado "BIOAUMENTACIÓN MEDIANTE EL USO DE MICROORGANISMOS AUTOCTONOS PARA EL TRATAMIENTO DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS TOTALES DE PETROLEO" a ser desarrollado para nuestra empresa, bajo las siguientes condiciones:

Nuestra empresa se compromete, de ser el caso, a facilitar el equipamiento, reactivos y consumibles necesarios para que el mencionado proyecto llegue a su feliz término.

La información que se entregue será clasificada por nuestra empresa y podrá ser divulgada solo con autorización expresa.

Se llevará seguimiento al trabajo efectuado, comprometiéndose a entregar una carta de conformidad al finalizar el proyecto.

Los resultados de dicho estudio son de propiedad del laboratorio AQLAB.

Atentamente,





Ing. Armando Meléndrez Lara
DIRECTOR TÉCNICO - AQLAB

Dirección: Calle Juan Huarte y Fray Gregorio de Aluminia, Barrio Con Hogar Sector Redonde! Vía al Auce
Tel.: 05 2288 1715 / 0991666658 / 0993038813
www.aqlabec.com - laboratorio@aqlabec.com / info@aqlabec.com
Coca - Orellana - Ecuador

C.A. 19-004

ANEXO: RECIBIDO DE OFICIO PARA LA INVESTIGACIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN



ESPOCH
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Riobamba, 19 de Diciembre de 2018

Ing. Armando Meléndez
Administrador del Laboratorio de Análisis y Evaluación Ambiental - AqLab

Presente. -


De mi consideración:

Reciba un atento y cordial saludo, a la vez que me permito desearle los mejores éxitos en sus funciones.


Yo, **Edwin Geovanny Licta Vega**, con cédula de identidad 040179575-2, estudiante del décimo semestre de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, me dirijo a usted para solicitarle comedidamente se digne autorizar a quien corresponda la realización de la tesis de pregrado con nombre "Bioamentación mediante el uso de microorganismos autóctonos para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos totales de petróleo" en su empresa, bajo la tutoría de Karina Paredes PhD Docente de la Facultad de Ciencias.

Por la gentil atención y comprensión que se digne dar a la presente, me permito anticiparle mis más sinceros agradecimientos.

Cordialmente. -



Edwin Geovanny Licta Vega
C.I. 040179575-2



20 DIC. 2018

Recibido Hora: 12:30
Responsable: Armando Meléndez

ANEXO H: CERTIFICADO DE ACREDITACIÓN DEL LABORATORIO AQLAB

CERTIFICADO DE ACREDITACIÓN
AQLAB LABORATORIOS ACOSTA Y COMPAÑÍA

FRANCISCO DE ORELLANA - ECUADOR

Se encuentra acreditado por el Servicio de Acreditación Ecuatoriano en cumplimiento con los requisitos establecidos en la:

Norma NTE – INEN ISO/IEC 17025:2005 "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración", equivalente a la Norma ISO/IEC 17025:2005.

Esta acreditación demuestra la competencia técnica para la ejecución de los ensayos detallados en el Alcance de Acreditación *, que se realizan en las focalizaciones identificadas en el mismo.

**Acreditación N° SAE LEN 14-009
LABORATORIO DE ENSAYOS**


Carlos Echeverría Cuera
Mgo. Carlos Echeverría Cuera
DIRECTOR EJECUTIVO (E)
SERVICIO DE ACREDITACIÓN ECUATORIANO



ACREDITACIÓN INICIAL:	20140702	(Oficio N° SAE DE 14-011)	EXPIRA:	20190701
AMPLIACIÓN:	20180628	(Resolución N° SAE-ACR-0125-2018)	EXPIRA:	20190701
RENOVACIÓN 1:	20180607	(Resolución N° SAE-ACR-0188-2018)	EXPIRA:	20240606

La acreditación está condicionada al cumplimiento continuo por parte del laboratorio con los requisitos de acreditación, por lo que la vigencia del presente certificado de acreditación debe ser consultada en la página web del SAE, www.acreditacion.gob.ec.

* SAE es firmante de los Acuerdos de Reconocimiento Mutuo firmado entre Organismos Nacionales de Acreditación con IAAC e ILAC

El presente certificado solo tiene validez con su correspondiente Alcance de Acreditación

Este certificado reemplaza al certificado N° QAE LE C 14-009 y SAE LEN 15-015
del Sistema Ecuatoriano de la Calidad Art. 21
2011-04-284

19027A-EN012718-06-07


ANEXO I: CERTIFICADO DE LA CEPA *PSEUDOMONAS AUREGINOSA*

Microbiologics®
Certificate of Analysis: Laminated Microorganisms Identification and Performance User Release

Specifications Microorganism Name: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Catalog Number: 0993 Lot Number: 093-132™ Reference Number: ATCC® 15442™ Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2019/10/31 Release Information: Quality Control Technologist: Jennifer Holub Release Date: 2018/3/7				
<p style="text-align: center;">Performance</p> <table border="0"> <tr> <td data-bbox="311 638 861 728"> Macroscopic Features: Cream, low convex, circular to irregular shaped, rough, gray with weak beta hemolysis; opacity types, on is taller, spreading & the other is smaller, lighter in color. </td> <td data-bbox="869 616 1300 683"> Medium: SBAP </td> </tr> <tr> <td data-bbox="311 716 861 761"> Microscopic Features: Straight or slightly curved gram negative rod. </td> <td data-bbox="869 694 1300 750"> Method: Gram Stain (1) </td> </tr> </table>		Macroscopic Features: Cream, low convex, circular to irregular shaped, rough, gray with weak beta hemolysis; opacity types, on is taller, spreading & the other is smaller, lighter in color.	Medium: SBAP	Microscopic Features: Straight or slightly curved gram negative rod.	Method: Gram Stain (1)
Macroscopic Features: Cream, low convex, circular to irregular shaped, rough, gray with weak beta hemolysis; opacity types, on is taller, spreading & the other is smaller, lighter in color.	Medium: SBAP				
Microscopic Features: Straight or slightly curved gram negative rod.	Method: Gram Stain (1)				
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (force): positive (1) Motility B Medium: positive				
<p style="text-align: center;"><i>Amanda Kuperus</i></p> <p style="text-align: center;">Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE</p>					
<p><small>*Disclaimer: The lot (digit) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual lot number.</small></p> <p><small>Tests for identity through the World Health Organization's (WHO) standard using many commercial tests. The unique environment of the work, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other products.</small></p> <p><small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and traceability information.</small></p> <p><small>Laminated products are available in a single-dose culture collection.</small></p>					
 ACCREDITED NATIONAL INSTITUTE FOR STANDARDS & TECHNOLOGY NIST 7000.10	(*) The ATCC Licensed Database System, the ATCC Licensed Database report mark and the ATCC report mark are trademarks of ATCC Microbiology, Inc. It is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.				
	(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.				
 ACCREDITED TESTING CERT #2625.01					

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303 Page 1 of 1 DOC.285

ANEXO J: CERTIFICADO DE CONTROL DE CALIDAD DE LOS ANÁLISIS FÍSICOS, QUÍMICOS, BIOLÓGICOS DE AQLAB.



Laboratorio de ensayo
acreditado por el SAE

CERTIFICADO DE CONTROL DE CALIDAD N°2019-001

ESPOCH
Solicitado por: Edwin Licta Vega
Dirección: Riobamba, Los Olivos.


Fecha y hora Inicial de Análisis:	2019/03/20 10:00	Fecha final de Análisis:	2019/03/28	T máx 35°C T mín 22°C
Toma de muestra:	Edwin Geovanny Licta Vega	Fecha y Hora	2019/03/27	08:45

Identificación: Suelo en Proceso de Biorremediación Mediante Bioaumentación


Parámetros, métodos y resultados:


Parámetros	Método de Ensayo	Referencia	2) Límite Máximo Permissible (®)	Unidad	Resultado	Incertidumbre (K = 2)
*Carbono Orgánico Total	ITE-AQLAB-54	EPA 9060	**	%	2,5	-
*Conductividad Eléctrica	ITE-AQLAB-53	EPA 9050 A	< 2.000	µS/cm	240	-
*Fósforo disponible	ITE-AQLAB-51	Booker Tropical Soil Manual	**	mg/Kg	257,3	-
*Humedad	ITE-AQLAB-57	ASTM D3976-92	**	%	73	-
*Materia Orgánica	ITE-AQLAB-58	Gravimétrico	**	%	4	-
*Potencial hidrógeno	ITE-AQLAB-52	EPA 9045 C	6 - 8	-	7,32	-
*Pseudomonas sp.	ITE-AQLAB-29/63/82	SM 9213 E, AOAC.2003.07.2005	**	UFC	1	-
*Nitrógeno Total	ITE-AQLAB-59	KJEDAHL, EPA 351.2	**	%	0,22	-

Fuente: TULSMA, Decreto Ejecutivo 3516, Registro Oficial Edición Especial 2 de 31-mar-2003, Última modificación: 29-mar-2017, Estado Reformado, libro VI, Anexo 2, Tabla No. 2, Guía de Parámetros Mínimos para Valoración de la Calidad Inicial del Suelo Según Uso del Suelo, apartado 4.3.2, Características Químicas del Suelo, Fertilidad.
 2) Límite Máximo Permissible en Uso Agrícola.
 ** - Actualmente no se encuentra establecido el límite permisible en las tablas del TULSMA.
 1. Indeterminado, pero se verifica la presencia de esta especie bacteriana.



Ing. Armado Meléndez Lara
DIRECTOR TÉCNICO
Autorización





Ing. Nelson Shiguango
ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA
Revisado

Francisco de Orellana, 19 de julio de 2019

Los límites permisibles de las Normativas (®) y los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE.
 El informe sólo refiere a la muestra presentada a ensayo. Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio sin el permiso escrito del laboratorio.
 Calle Juan Huicite y Fray Gregorio de Aluminia, detrás de Coopesonario Mizada - Barrio Con Hogar
 e-mail: laboratorio@aqllabec.com - web: www.aqllabec.com - Teléfono: (593) 6 2881715 - Celular: 9991666838

MC2307-01 Página 1 de 6

CERTIFICADO DE CONTROL DE CALIDAD N°2019-002

ESPOCH

Solicitado por: Edwin Licta Vega
Dirección: Kiohumba, Los Olivares, Calle Otto Arosemena

Fecha y hora Inicial de Análisis:	2019/06/04 09:00	Fecha final de Análisis:	2019/06/13	T máx: 35°C T mín: 22°C
Toma de muestra:	Edwin Geovanny Licta Vega	Fecha y Hora:	2019/06/04	08:35

Identificación: Suelo en Proceso de Biorremediación Mediante Bioacumulación.

Parámetros, métodos y resultados:

Parámetros	Método de Ensayo	Referencia	2) Límite Máximo Permisible	Unidad	Resultado	Incertidumbre (K = 2)
*Carbono Orgánico Total	ITE-AQLAB-54	EPA 9060	**	%	1,5	-
*Conductividad Eléctrica	ITE-AQLAB-53	EPA 9050 A	< 2 000	µS/cm	288	-
*Fósforo disponible	ITE-AQLAB-51	Booker Tropical Soil Manual	**	mg/Kg	206,7	-
*Humedad	ITE-AQLAB-57	ASTM D3976-92	**	%	67	-
*Materia Orgánica	ITE-AQLAB-58	Gravimétrico	**	%	2,6	-
*Potencial hidrógeno	ITE-AQLAB-52	EPA 9045 C	6-8	-	7,30	-
*Paradomonas sp	ITE-AQLAB-29/63/82	SM 9213 E, AOAC,2003.07.2005	**	UFC	1	-
*Nitrógeno Total	ITE-AQLAB-59	KJEDAHL, EPA 351.2	**	%	0,13	-

Fuente: TULSMA, Decreto Ejecutivo 3516, Registro Oficial Edición Especial 2 de 31-mar.-2003, Última modificación: 29-mar.-2017, Estado: Reformado, libro VI, Anexo 2: Tabla No. 2. Guía de Parámetros Mínimos para Valoración de la Calidad Inicial del Suelo Según Uso del Suelo, apartado 4.3.2. Características Químicas del Suelo, Fertilidad.


2) Límite Máximo Permisible en Uso agrícola

** Actualmente no se encuentra establecido el límite permisible en las tablas del TULSMA.

1) Indeterminado, pero se verifica la presencia de esta especie bacteriana.



Ing. Armando Meléndrez Lara
DIRECTOR TÉCNICO
Autorización

Ing. Nelson Shigango
ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA
Revisado

Francisco de Orellana, 19 de julio de 2019

Los límites permisibles de las Normativas (N) y los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE. El informe sólo afecta a la muestra sometida a ensayo. Prohíbida la reproducción total o parcial por cualquier medio sin el permiso escrito del laboratorio.

Calle Juan Francisco y Fray Gregorio de Alvarado, detrás de Concepcionario Maeda - Barrio Con Hogar
e-mail: laboratorio@aqllabec.com - web: www.aqllabec.com Teléfono: (593) 6 2881715 Celular: 0991666858

CERTIFICADO DE CONTROL DE CALIDAD N°2019-003

ESPOCH

Solicitado por: Edwin Licta Vega
Dirección: Jibamba, Los Olivos

Fecha y hora Inicial de Análisis:	2019/07/15 10:00	Fecha final de Análisis	2019/07/17	T máx. 35°C T mín. 22°C
Toma de muestra:	Edwin Geovanny Licta Vega	Fecha y Hora	2019/07/15	08:49

Identificación: Suelo en Proceso de Biorremediación Mediante Bioaugmentación.

Parámetros, métodos y resultados:

Parámetros	Método de Ensayo	Referencia	2) Límite Máximo Permissible [®]	Unidad	Resultado	Incertidumbre (K = 2)
*Carbono Orgánico Total	ITE-AQLAB-54	EPA 9060	**	%	1,0	-
*Conductividad Eléctrica	ITE-AQLAB-53	EPA 9050 A	< 2 000	µS/cm	252	-
*Fósforo disponible	ITE-AQLAB-51	Booker Tropical Soil Manual	**	mg/Kg	147,2	-
*Humedad	ITE-AQLAB-57	ASTM D3976-92	**	%	68	-
*Materia Orgánica	ITE-AQLAB-58	Gravimétrico	**	%	1,74	-
*Potencial hidrógeno	ITE-AQLAB-52	EPA 9045 C	5 - 8	-	7,64	-
*Pseudomonas sp.	ITE-AQLAB-29/63/82	SM 9213 E, AOAC.2003.07.2005	**	UFC	1	-
*Nitrógeno Total	ITE-AQLAB-59	KJEDAHL, EPA 351.2	**	%	0,09	-

Fuente: TULSMA, Decreto Ejecutivo 3516, Registro Oficial Edición Especial 2 de 31-mar-2003, Última modificación: 29-mar-2017, Estado: Reformado, libro VI, Anexo 2, Tabla No. 2, Guía de Parámetros Mínimos para Valoración de la Calidad Inicial del Suelo Según Uso del Suelo, apartado 4.3.2, Características Químicas del Suelo, Fertilidad.

2) Límite Máximo Permissible en Uso agrícola

** Actualmente no se encuentran establecidos el límite permisible en las tablas del TULSMA.

† Indeterminado, pero se verifica la presencia de esta especie bacteriana.



Ing. Armando Meléndez Lara
DIRECTOR TÉCNICO
Autorización




Ing. Nelson Shiguango
ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA
Revisado

Francisco de Orellana, 19 de julio de 2019

Los límites permisibles de las Normativas (®) y los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE. El informe sólo afecta a la muestra sometida a ensayo. Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio sin el permiso escrito del laboratorio.

Calle Juan Montalvo y Fray Gregorio de Alvarado, detrás de Concesionario Mazda - Barrio Con Híper
e-mail: laboratorios@aqlab.com - web: www.aqlab.com - Teléfono: (593) 6 2881715 - Celular: 0991666858

CERTIFICADO DE CONTROL DE CALIDAD N°2019-004

ESPOCH

Solicitado por: Edwin Geovanny Licta Vega
Dirección: Rimbamba, Los Olivos

Fecha y hora Inicial de Análisis:	2019/03/27 10:00	Fecha final de Análisis:	2019/07/16	T máx. 35°C T mín. 22°C
Toma de muestra:	Edwin Geovanny Licta Vega			
Identificación:	Suelo Patrón en Proceso de Biorremediación Mediante Bioaumentación			Código: MP
Parámetro:	Hidrocarburos totales de petróleo (TPH s)	Método de Ensayo:	ITE-AQLAB-56	Documentos de Referencias:
				EPA 418.1, 1664; ASTM D3976-92

Métodos y resultados:

Fecha de Análisis	2) Límite Máximo Permisible #	Resultados (TPH's)	1) Unidad	Incertidumbre (K = 2)
27/03/2019	< 2.500	20.640	mg/Kg	± 28%
19/04/2019	< 2.500	13.033	mg/Kg	± 28%
17/05/2019	< 2.500	7.310	mg/Kg	± 28%
06/06/2019	< 2.500	3.821	mg/Kg	± 28%
26/06/2019	< 2.500	1.955	mg/Kg	± 28%
16/07/2019	< 2.500	736	mg/Kg	± 28%

Fuente: Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarbúricas Decreto Ejecutivo 1215 Registro Oficial 265 de 13-feb-2011 Última modificación: 29-sep-2010 Estado Vigente.

Tabla 6. Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarbúrica, incluidas las estaciones de servicios.

1) Expresado en base de sustancia seca (gravimétrico, 105°C, 24 horas)

2) Valores límites permisibles enfocados en la protección de suelos y cultivos, uso agrícola

MP: Código de muestra patrón del suelo en tratamiento.


Ing. Armando Meléndez Lara
DIRECTOR TÉCNICO
Autorización




Ing. Nelson Shiguango
ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA
Revisado

Francisco de Orellana, 19 de julio de 2019

Los límites permisibles de las Normativas (R) y los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE.

El informe sólo sirve a la muestra asociada a ensayo. Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio sin el permiso escrito del laboratorio.

Calle Juan Huancá y Fray Gregorio de Almoneda, detrás de Concesionario Mazda - Barrio Con Hogar

e-mail: laboratorio@aqlabec.com | web: www.aqlabec.com | Teléfono: (593) 6 2881715 | Celular: 0991066858

CERTIFICADO DE CONTROL DE CALIDAD N°2019-005

ESPOCH

Solicitado por: Edwin Geovanny Licta Vega

Dirección: Riohamba, Los Olivos.

Fecha y hora Inicial de Análisis:	2019/04/25	10:00	Fecha final de Análisis:	2019/07/16	T máx: 35°C T mín: 22°C
Toma de muestra:	Edwin Geovanny Licta Vega				

Identificación:	Suelo en Proceso de Biorremediación Mediante Bioaumentación con <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Código de muestra:	SE
Parámetro	Método de Ensayo	Documentos de Referencias	
Hidrocarburos totales de petróleo (TPH's)	ITE-AQLAB-56	EPA 418.1, 1664, ASTM D3976-92	

Resultados:

Fecha de Análisis	Limite Máximo Permissible 2)	Resultados de TPH's				Unidad 1)	Incertidumbre (K=2)
		SE	SE.a	SE.b	SE.c		
25/04/2019	< 2 500	9 366	-	-	-	mg/Kg	± 28%
17/05/2019	< 2 500	8 089	7 766	7 551	7 914	mg/Kg	± 28%
06/06/2019	< 2 500	5 406	4 511	5 751	4 931	mg/Kg	± 28%
26/06/2019	< 2 500	2 991	3 026	3 102	2 991	mg/Kg	± 28%
16/07/2019	< 2 500	2 062	1 987	2 046	1 890	mg/Kg	± 28%

Fuente: Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas Decreto Ejecutivo 1215 Registro Oficial 265 de 13-feb-2001. Última modificación: 29-sep-2010 Estado: Vigente.

Tabla 6: Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicios.

1) Expresado en base de sustancia seca (gravimétrico; 105°C, 24 horas).

2) Valores límites permisibles enfocados en la protección de suelos y cultivos, en uso agrícola.

SE: Suelo Esterilizado con *Pseudomonas aeruginosa*; (a, b, c) réplicas del mismo suelo.

-: No se realizó el análisis de muestra.



Ing. Armando Meléndez Lara
DIRECCIÓN TÉCNICA
Autorización




Ing. Nelson Shiguango
ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA
Revisado

Francisco de Orellana, 19 de julio de 2019

Los límites permisibles de las Normativas (®) y los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE. El informe sólo afecta a la muestra sometida a ensayo. Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio sin el permiso escrito del laboratorio.

Calle Juan Humane y Fray Gregorio de Alencastro, detrás de Concesionario Mazda - Barrio Con Hogar

e-mail: laboratorio@aqlabec.com - web: www.aqlabec.com Teléfono: (393) 6 2881715 Celular: 0991666858

CERTIFICADO DE CONTROL DE CALIDAD N°2019-006

ESPOCH

Solicitado por: Edwin Geovanny Licta Vega
Dirección: Robamba, Los Olivos

Fecha y hora Inicial de Análisis:	2019/03/27 10:00	Fecha final de Análisis	2019/07/16	T máx: 35°C T mín: 22°C
Toma de muestra:	Edwin Geovanny Licta Vega			
Identificación:	Suelo en Proceso de Biorremediación Mediante Bioaumentación con <i>Pseudomonas sp.</i>		Código de muestra:	SN
Parámetro	Método de Ensayo	Documentos de Referencias		
Hidrocarburos totales de petróleo (TPH's).	ITE-AQLAB-56	EPA 418.1, 1664, ASTM D3976-92		

Resultados:

Fecha de Análisis	Límite Máximo Permisible 2) @	Resultados de TPH's				Unidad 1)	Incertidumbre (K = 2)
		SN	SN.a	SN.b	SN.c		
25/04/2019	< 2.500	8.977	-	-	-	mg/Kg	± 28%
17/05/2019	< 2.500	5.674	6.346	4.828	4.744	mg/Kg	± 28%
06/06/2019	< 2.500	3.413	2.582	3.304	2.670	mg/Kg	± 28%
26/06/2019	< 2.500	1.696	2.050	1.841	1.842	mg/Kg	± 28%
16/07/2019	< 2.500	1.087	990	962	935	mg/Kg	± 28%

Fuente: Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas Decreto Ejecutivo 1215 Registro Oficial 265 de 13-feb-2001 Última modificación: 29-sep-2010 Estado: Vigente.

Tabla 6: Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicios.

1) Expresado en base de sustancia seca (gravimétrico; 105°C, 24 horas).

2) Valores límites permisibles enfocados en la protección de suelos y cultivos, en uso agrícola.

SN: Suelo Nativo con *Pseudomonas sp.*; (a, b, c) réplicas del mismo suelo.

- No se realizó el análisis de muestra



Ing. Armando Meléndez Lira
DIRECTOR TÉCNICO
Autorización




Ing. Nelson Shiguango
ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA
Revisado

Francisco de Orellana, 19 de julio de 2019.

Los límites permisibles de las Normativas (R) y los ensayos marcados con (*) no están marcados en el listado de la acreditación del SAE.

El informe sólo afecta a la muestra sometida a ensayo. Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio sin el permiso escrito del laboratorio.

Calle Juan Huacata y Fray Gregorio de Almirante, detrás de Concesionario Mazda - Barrio Con Hogar.

e-mail: laboratorio@aqlabec.com - web: www.aqlabec.com - Teléfono: (593) 6 2881715 - Celular: 0991666858

ANEXO K: MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANO.

Medio	Descripción	Preparación	Recomendaciones	Formula Química		
				Formula	Cantidad	Unidad
<i>Difco™ Pseudomonas Insolation Agar</i>	Es un medio rico en nutrientes y recomendado para recuperar la mayor cantidad de colonias bacterianas posibles del suelo o agua. Polvo base para insolación e identificación de <i>Pseudomonas</i> .	Pesar 45 g de polvo en 1 L, suspender el agua destilada con 20 ml de glicerol. Mezclar bien. Calentar con agitación frecuente y esterilizar durante 1 minuto en autoclave para completar la disolución del polvo.	Recomendamos realizar una revisión funcional del enfoque nutritivo final utilizando controles típicos definidos. Ajustado y/o suplementado según sea necesario para cumplir con los criterios de desempeño. Para uso de laboratorio /pH final 7,0 ±0,2. Higroscópico /Mantener el contenedor bien cerrado	Cloruro de magnesio	1,4	g/L
				Sulfato de potasio	10	g/L
				Irgasan™	25	mg/L
				Agar	13,6	g/L
<i>Agua de peptona tamponada, GranuCult™</i>	Este medio de cultivo es utilizado para el enriquecimiento preliminar no selectivo de bacterias, particularmente Enterobacteriaceae patógenas como <i>Salmonella</i> y <i>Cronobacter</i> , de alimentos y piensos, agua y otros materiales. (EDQMH, 2001)	Disolver 25.5 g en 1 L de agua purificada. Si lo desea, dispense en recipientes más pequeños y autoclave 15 min a 121 ° C. El medio preparado es claro y amarillento. El valor de pH a 25 ° C está en el rango de 6.8-7.2, cuyo rango se establece la EN ISO/FDIS 6579-1:2015 y EN ISO 21528-1:2004.	Almacenar a una temperatura de +15 ° C a +25 ° C, seco y bien cerrado. No utilizar medios agrupados o decolorados. Proteger de la luz UV (incluida la luz solar). Sólo para uso in vitro (Edel & Kampelmacher, 1973). De acuerdo con la norma EN ISO / FDIS 6579-1, el medio de preparación automática se puede almacenar en recipientes cerrados a una temperatura de entre +2 ° C y +8 ° C en la oscuridad y protegerse contra la evaporación hasta por seis meses. 3.57 g Na2HPO4 anhidro es equivalente a 9 g Na2HPO4 x 12 H2O	Peptona (incluye digestión enzimática de caseína)	10	g/L
				NaCl	5	g/L
				Na2HPO4 x 12 H2O	9	g/L
				KH2PO4	1.5	g/L
<i>Plate Count Agar Placa de 90 mm (PCA)</i>	Desarrollado por Buchbinder, Baris y Goldstein en 1953, esta formulación está especificada en Standard Methods para el examen del agua y las aguas residuales. En los agares se suministran las fuentes de nitrógeno y de vitaminas que requieren para el crecimiento de microorganismos, la glucosa es la fuente de energía. Se prepara según la fórmula de la USP y recomendaciones de la APHA (American Public Health Association) La transparencia del medio y el buen tamaño de las colonias al crecer facilitan los recuentos bacterianos (APHA, 2015).	Estas placas han sido inoculadas con la cepas que a continuación se indican, incubadas de 32 a 36 °C en condiciones aeróbicas y examinadas transcurridas de 18 a 48 horas de la inoculación, para bacterias y <i>Candida</i> sp.	Este producto es para uso exclusivo de profesionales. No debe ser utilizado en caso de presentar contaminación microbiana, decoloración, signos de deshidratación, roturas u otros signos de deterioro. Utilizar bajo procedimientos de laboratorio tratar siempre como material biopeligroso.	Hidrolizado pancreático de caseína (Tryptona)	5.0	g/L
				Extracto de levadura	2.5	g/L
				Glucosa	1.0	g/L
				Agar	15.0	g/L

<p><i>Brain Heart Infusion Caldo (BHI)</i></p>	<p>Es un medio de uso general adecuado para el cultivo de una amplia variedad de tipos de organismos, incluidos las bacterias, levaduras y hongos filamentosos, a partir de muestras clínicas, incluidos muchos tipos de patógenos. Se ha utilizado como medio base para las nuevas fórmulas de medios de cultivo cuando se suplementa con sangre o agentes selectivos</p>		<p>*Fórmula por litro de agua purificada con un pH 7,4 ± 0,2 *Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.</p>	<p>Infusión de cerebro y corazón (sólidos)</p>	<p>250</p>	<p>g/L</p>
<p><i>Medio King B</i></p>	<p>El medio King B permite la detección de la síntesis de pioverdina, un pigmento producido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y otras especies de <i>Pseudomonas</i>. Usado en paralelo con el medio King A (detección de piocianina), puede usarse para guiar en la identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (KING, et al., 1954).</p>	<p>Se debe inocular haciendo una raya en la línea media sobre la superficie del agar con un asa de cultivo puro, fresco, tomado de un caldo o medio de agar. Volver a colocar la parte superior de rosca sin apretar.</p>	<p>Incubar durante 24 a 48 horas a 30°C. La incubación durante un tiempo mayor es inútil, pero los cultivos pueden conservarse a temperatura ambiente (18-30°C). El medio King B se elabora de acuerdo con la fórmula teórica descrita por King, Ward y Raney realizada en (1954). Las sales deben ser regular a un PH de 7.2 ± 0,2 con HCl o NaOH a 25°C</p>	<p>Infusión de cerebro de ternera</p>	<p>200</p>	<p>g/L</p>
				<p>Proteasa peptonas</p>	<p>10</p>	<p>g/L</p>
				<p>Cloruro sódico</p>	<p>5</p>	<p>g/L</p>
				<p>Fosfato disódico de hidrógeno</p>	<p>2,5</p>	<p>g/L</p>
				<p>Dextrosa</p>	<p>2</p>	<p>g/L</p>
				<p>Peptona</p>	<p>20</p>	<p>g/L</p>
				<p>Agar purificado</p>	<p>12</p>	<p>g/L</p>
				<p>KH₂PO₄ (anhidro)</p>	<p>1.5</p>	<p>g/L</p>
				<p>M gSO₄. 7 H₂O (anhidro)</p>	<p>1.5</p>	<p>g/L</p>

ANEXO L: CONSTRUCCIÓN DEL INVERNADERO

a)



NOTAS:	CATEGORIA DEL DIAGRAMA:	<p align="center">ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS ING. EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL</p>	TEMA: Bioaumentación Mediante el uso de Microorganismos Autóctonos para el Tratamiento de Suelos Contaminados con Hidrocarburos Totales de Petróleo.		
a. Fotografías de los materiales e insumos usados para la construcción del invernadero para el tratamiento del suelo.	<input checked="" type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Por calificar		LÁMINA	ESCALA	FECHA
			1	1:1	21/03/2019

ANEXO M: MUESTREO DEL SUELO



NOTAS:	CATEGORIA DEL DIAGRAMA:	ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS ING. EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL	TEMA: Bioaumentación Mediante el uso de Microorganismos Autóctonos para el Tratamiento de Suelos Contaminados con Hidrocarburos Totales de Petróleo.		
b. Muestreo de en rejillas de 5 x 5 cm c. Barreno de 1 m largo y 2 pulg de espesor. d. Fundas zipzapt recubiertas de papel aluminio.	<input checked="" type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Por calificar		LAMINA	ESCALA	FECHA
			2	1:1	19/03/2019

ANEXO N: ANÁLISIS INICIALES DE pH Y CE DEL SUELO



e)



f)



g)



NOTAS:	CATEGORIA DEL DIAGRAMA:	ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS ING. EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL	TEMA: Bioaumentación Mediante el uso de Microorganismos Autóctonos para el Tratamiento de Suelos Contaminados con Hidrocarburos Totales de Petróleo.		
e. Dilución de 20 g de suelo en 40 y 100 ml de agua destilada para pH y CE.	<input checked="" type="checkbox"/> Aprobado		LÁMINA	ESCALA	FECHA
f. pH inicial del suelo a tratar. g. Conductividad Eléctrica del suelo a tratar.	<input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Por calificar		3	1:1	19/03/2019

ANEXO O: ANÁLISIS DE TPH's INICIAL DEL SUELO CONTAMINADO

h)

i)

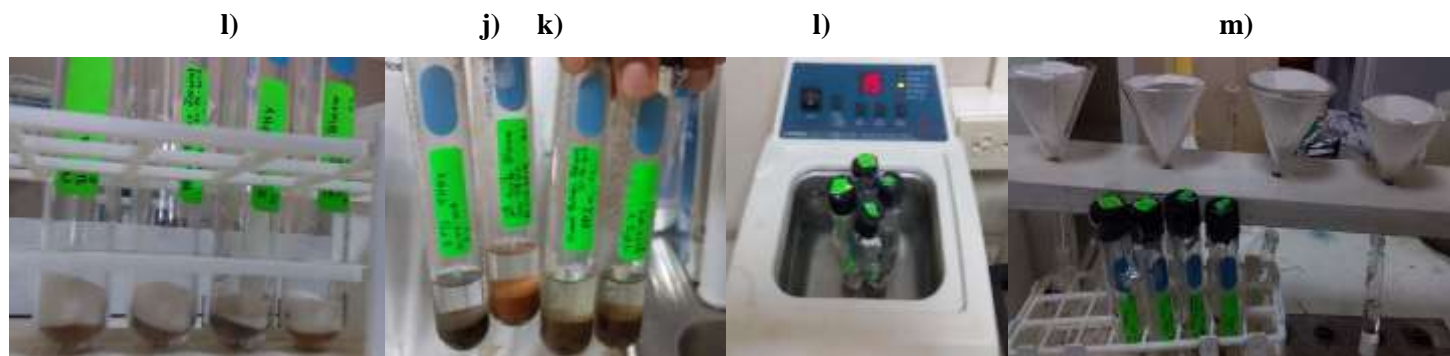
j)

k)



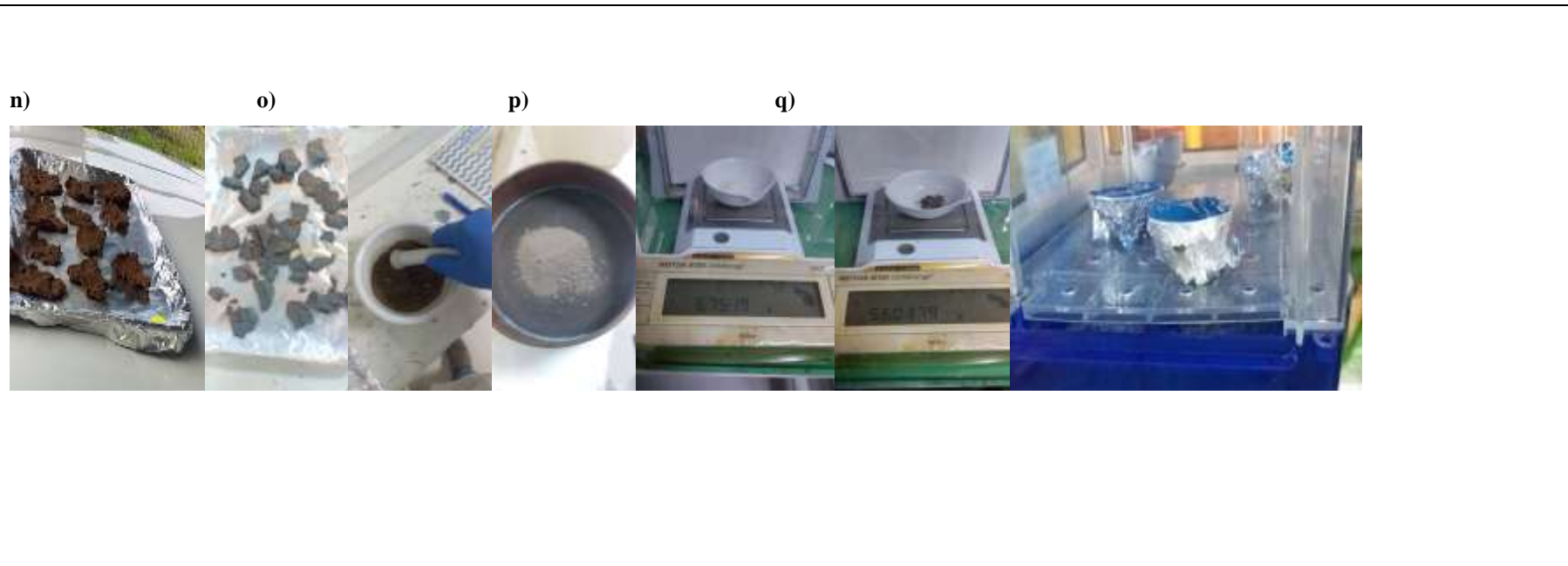
<p>NOTAS:</p>	<p>CATEGORIA DEL DIAGRAMA:</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS ING. EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL</p>	<p>TEMA: Bioaumentación Mediante el uso de Microorganismos Autóctonos para el Tratamiento de Suelos Contaminados con Hidrocarburos Totales de Petróleo.</p>		
<p>h) Temperatura del suelo i) Secado del suelo en bandejas j) Reactivos y estándar de suelo k) Pesaje del suelo aprox. 2 g.</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Por calificar</p>		<p>LÁMINA</p>	<p>ESCALA</p>	<p>FECHA</p>
		<p>4</p>	<p>1:1</p>	<p>20/03/2019</p>	

ANEXO P: ANÁLISIS DE TPH's INICIAL DEL SUELO CONTAMINADO



NOTAS:	CATEGORIA DEL DIAGRAMA:	ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS ING. EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL Autor: Edwin Licta	TEMA: Bioaumentación Mediante el uso de Microorganismos Autóctonos para el Tratamiento de Suelos Contaminados con Hidrocarburos Totales de Petróleo.		
i) Colocar reactivos 1 g de Sílica gel y 1 g Na ₂ SO ₄ j) Colocar 10ml de Hexano y agitar. k) Dejar en el ultrasonido por 15 min. l) Filtrar y aforar en viales de 10ml. m) Análisis de Absorbancia de muestras con 0,1ml, previa calibración.	<input checked="" type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Por calificar		LÁMINA	ESCALA	FECHA
		5 1 :1 10/12/2018			

ANEXO Q: DETERMINACIÓN DE SUSTANCIA SECA PARA TPH's



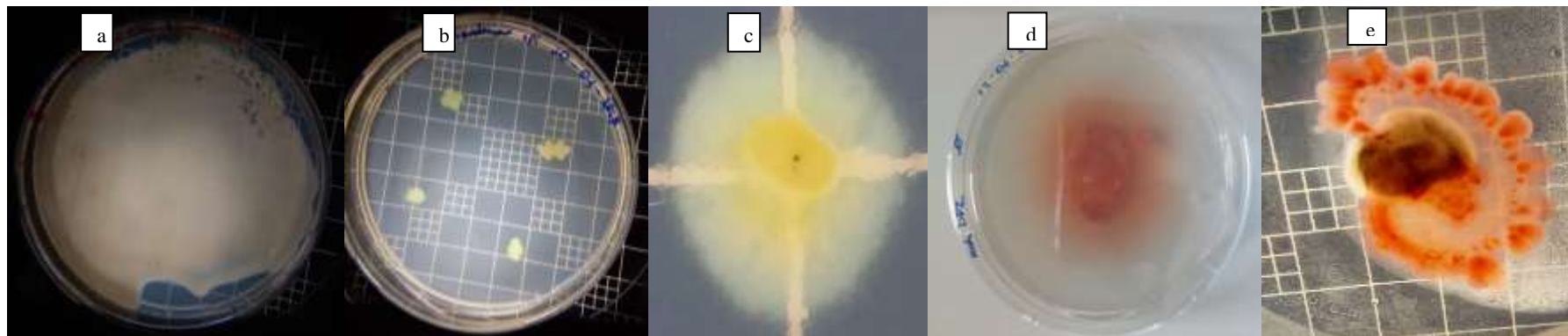
<p>NOTAS:</p>	<p>CATEGORIA DEL DIAGRAMA:</p>	<p align="center"> ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS ING. EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL Autor: Edwin Licta </p>	<p>TEMA: Bioaumentación Mediante el uso de Microorganismos Autóctonos para el Tratamiento de Suelos Contaminados con Hidrocarburos Totales de Petróleo.</p>		
<p>n) Secar muestra a TA, triturar y tamizar en 0,2mm o) Estabilizar el crisol en estufa a 105° C por 2 horas. Dejar al desecador por 30min, pesar el crisol vacío. p) Tarar y pesar 5g de suelo tamizado. q) Dejar en estufa por 24ha 105°C y en el desecador. q) Pesar el crisol total par los cálculos en Excel.</p>	<p> <input checked="" type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Por calificar </p>		<p>LÁMINA</p>	<p>ESCALA</p>	<p>FECHA</p>
		<p align="center">6</p>	<p align="center">1:1</p>	<p align="center">11/12/2018</p>	

ANEXO R: AISLAMIENTO A DE *Pseudomonas* sp.



NOTAS:	CATEGORIA DEL DIAGRAMA:	ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS ING. EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL Autor: Edwin Licta	TEMA: Bioaumentación Mediante el uso de Microorganismos Autóctonos para el Tratamiento de Suelos Contaminados con Hidrocarburos Totales de Petróleo.		
r) Pesar los medios de cultivo microbiano PCA, DPI y peptona. s) diluir con Agua destilada, colocar el indicador de esterilización biológico. t) Autoclave por 15min a 121° C.	<input checked="" type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Por calificar		LÁMINA	ESCALA	FECHA
			7	1:1	23/03/2019

ANEXO S: AISLAMIENTO B DE *Pseudomonas* sp.



NOTAS:	CATEGORIA DEL DIAGRAMA:	ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL Autor: Edwin Licta	TEMA: Bioaumentación Mediante el uso de Microorganismos Autóctonos para el Tratamiento de Suelos Contaminados con Hidrocarburos Totales de Petróleo.		
Aislamiento de <i>Pseudomonas</i> sp a las 24 horas de incubación a 35° C (a), siembra de una colonia a partir de la dilución 10 ⁻¹ (b), Morfología de la <i>Pseudomonas</i> (c).Aislamiento de una colonia de <i>Pseudomonas</i> sp de 48 h (d) ,72 horas de incubación a 35° C (e).	<input checked="" type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Por calificar		LÁMINA	ESCALA	FECHA
			8	1:1	28/03/2019



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE
CHIMBORAZO**

**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS PARA
EL APRENDIZAJE Y LA INVESTIGACIÓN**



**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS
REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA**

Fecha de entrega: 04/03/2020

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres EDWIN GEOVANNY Apellidos: LICTA VEGA
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: CIENCIAS
Carrera: CARRERA DE CIENCIAS QUIMICAS
Título a optar: INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL
f. Analista de Biblioteca responsable