



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

**“BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON
HIDROCARBUROS DERIVADOS DEL PETRÓLEO DEL
CAMPAMENTO SACHA 161 UTILIZANDO EL HONGO *Pleurotus
ostreatus*”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA
AMBIENTAL**

PRESENTADO POR

ÁNGEL ROBERTO DÉLEY ZÁRATE

RIOBAMBA - ECUADOR

2010

DEDICATORIA

Durante mi vida estudiantil recibí el apoyo incondicional y constante de quienes esperé y nunca me fallaron, aquellos que con sus consejos y paciencia estuvieron siempre a mi lado; por el amor y sacrificio de mis padres, este logro va para ellos

A la familia que confía en mí

A los amigos que arrimaron el hombro, dieron el empujón inicial, y continúan empujando

A todos gracias totales.

AGRADECIMIENTO

A mi Dios, por permitirme culminar esta jornada

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y a la Facultad de Ciencias por darme las oportunidades que recibí

A la Doctora Cecilia Veloz, tutora de este trabajo, que siempre estuvo atenta a cualquier inquietud y supo dirigir acertadamente cada paso de este estudio

Al CESTTA en nombre del Doctor Roberto Erazo, y al Proyecto Macro del Ministerio del Ambiente, quienes me dieron todas las facilidades para la realización de esta investigación

Al Laboratorio de Biología de la Facultad de Recursos Naturales en la persona del Ingeniero Rigoberto Mancheno, por su constante apoyo para sacar adelante este proyecto

A los miembros del Tribunal de Tesis por su aceptación

A Jenny y a todos los que siempre estuvieron prestos con su apoyo

CARGO

FIRMA

FECHA

Dra. Yolanda Díaz

DECANA FAC. CIENCIAS

Dr. José Vanegas

DIR. ESC. CIEN. QUÍMICAS

Dra. Nancy Veloz

DIRECTORA DE TESIS

Dr. Roberto Erazo

MIEMBRO DE TRIBUNAL

Sr. Carlos Rodríguez

**DIRECTOR CENTRO
DE DOCUMENTACIÓN**

NOTA DE TESIS ESCRITA

“Yo, ÁNGEL ROBERTO DÉLEY ZÁRATE,
soy responsable de las ideas, doctrinas y
resultados expuestos en esta Tesis; y el
patrimonio intelectual de la Tesis de Grado
pertenece a la ESCUELA SUPERIOR
POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO”.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

%	Por ciento
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
CESTTA	Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental
CO_2	Dióxido de Carbono
COT	Carbono orgánico total
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESPOCH	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
g	Gramos
h	Altura
H_2O	Agua
HAPS	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HR	Humedad relativa
kg	Kilogramos
LACIB	Laboratorio de Ciencias Biotecnológicas
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
m^2	Metro cuadrado
m^3	Metro cúbico
MAE	Ministerio del Ambiente del Ecuador
mg	Miligramos
mm Hg	Milímetros de mercurio
MO	Materia orgánica
NH_3	Amonio

nm	Nanómetros
OAE	Organismo de acreditación Ecuatoriano
ONG	Organización no Gubernamental
<i>P.</i>	<i>Pleurotus</i>
PDA	Potato dextrosa agar
PEPDA	Proyecto Eliminación de Piscinas Contaminadas en el Distrito Amazónico
PI	potencial de ionización
ppm	Partes por millón
PRAS	Programa de Reparación Ambiental y Social
r	Radio
RAOHE	Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas del Ecuador
RHP	Recuentos de heterótrofos en placa
TPH	Hidrocarburos totales de petróleo
var.	Variedad
Vs	Volumen de suelo
Ws	Peso del suelo

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

ÍNDICE DE ANEXOS

INTRODUCCIÓN

1.	MARCO TEÓRICO	14
1.1	La contaminación por hidrocarburos.....	14
1.2	La biorremediación.....	16
1.2.1	Métodos de biorremediación.....	18
1.3	Aplicaciones de hongos en tratamientos de biodescontaminación.....	19
1.4	Hongos ligninolíticos y compuestos xenobióticos.....	20
1.5	Lacasa.....	22
1.6	Oxidación biocatalítica de hidrocarburos poliaromáticos.....	23
1.7	Importancia de los hongos en la naturaleza.....	23
1.8	Descripción botánica el hongo.....	25
1.9	Características del <i>Pleurotus</i> sp.....	27
1.10	Generalidades sobre su cultivo.....	28
1.10.1	Siembra e incubación.....	28
1.10.2	Fructificación.....	28
1.11	Condiciones ambientales para el crecimiento de hongos.....	29
1.11.1	Temperatura.....	29
1.11.2	Concentración de iones hidrógeno.....	29
1.11.3	Aireación.....	30
1.11.4	Humedad.....	30
1.11.5	Luz.....	31
1.12	Marco legal.....	31
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.1	Lugar de la investigación.....	33
2.1.1	Ubicación geográfica.....	33
2.2	Materiales utilizados.....	35
2.3	Diseño experimental.....	36
2.3.1	Variables de control.....	36
2.3.2	Respuestas experimentales.....	36
2.3.3	Análisis de datos.....	37
2.4	Esquema de distribución de la investigación de laboratorio.....	37
2.5	Diagrama de flujo del proceso planteado.....	38
2.6	Toma de muestras y caracterización del suelo.....	39
2.6.1	Muestreo en calicatas.....	39
2.6.2	Muestreo de suelos en investigación.....	41

2.7	Preparación de las muestras de suelo.....	41
2.8	Métodos.....	42
3.	PARTE EXPERIMENTAL.....	43
3.1	Reactivación el micelio.....	43
3.2	Preparación de inóculos.....	44
3.3	Prueba preliminar.....	46
3.4	Inoculación con <i>Pleurotus ostreatus</i> en agar-petróleo.....	47
3.5	Inoculación en agar PDA.....	48
3.6	Preparación de un inóculo fúngico en medio líquido.....	49
3.7	Esterilización del suelo contaminado con hidrocarburos.....	50
3.8	Determinación de la masa fúngica.....	51
3.9	Inoculación de suelos esterilizados.....	52
3.10	Determinación de TPH.....	52
3.11	Preparación del sustrato.....	53
3.12	Inoculación de suelos no esterilizados.....	55
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
4.1	Caracterización del suelo.....	57
4.2	Reactivación el micelio.....	60
4.3	Preparación de inóculos.....	61
4.4	Prueba preliminar.....	62
4.5	Inoculación con <i>Pleurotus ostreatus</i> en agar-petróleo.....	63
4.6	Inoculación en agar PDA.....	64
4.7	Pruebas de crecimiento en agar petróleo.....	65
4.8	Preparación de un inóculo fúngico en medio líquido.....	68
4.9	Pruebas a partir de los inóculos en medio líquido.....	69
4.10	Inoculación de suelos esterilizados.....	69
4.11	Determinación de TPH de muestras esterilizadas.....	71
4.12	Resultados de la determinación de TPH de muestras no esterilizadas.....	77
4.13	Eficiencia del proceso.....	83
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	86
5.1	Conclusiones.....	86
5.2	Recomendaciones.....	88
6.	RESUMEN Y SUMMARY.....	89
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	92
8.	ANEXOS.....	102

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Compuestos xenobióticos degradados por cultivos de hongos de la podredumbre blanca.....	21
TABLA No. 2	Rango óptimo de los principales factores que afectan el crecimiento de las especies del género <i>Pleurotus</i>	31
TABLA No. 3	<u>TABLA 6</u> : Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicios...	32
TABLA No. 4	Variables de control.....	36
TABLA No. 5	Distribución de las muestras de suelo.....	37
TABLA No. 6	Métodos de análisis.....	42
TABLA No. 7	Descripción de los valores de fondo.....	58
TABLA No. 10	Análisis de resultados de las muestras tomadas como línea base fuera del sector contaminado.....	59
TABLA No. 11	Análisis general de resultados.....	59
TABLA No. 12	Comparación de resultados obtenidos de todas las muestras tomadas a diferentes profundidades con el reglamento ambiental para operaciones hidrocarburíferas DINAPA 1215.....	59
TABLA No. 13	Análisis de varianza para las muestras esterilizadas.....	75
TABLA No. 14	Prueba de Tukey para las muestras esterilizadas.....	76
TABLA No. 15	Análisis de varianza para las muestras no esterilizadas.....	82
TABLA No. 16	Prueba de Tukey al 5% para las muestras no esterilizadas.....	83
TABLA No. 17	Porcentaje de eficiencia en la biorremediación en suelos esterilizados y no esterilizados.	84

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Diagrama de flujo del proceso planteado.....	38
GRÁFICO No. 2	Curva de disminución de TPH para la muestra blanco.....	72
GRÁFICO No. 3	Curva de disminución de TPH para la concentración C1.....	72
GRÁFICO No. 4	Curva de disminución de TPH para la concentración C2.....	73
GRÁFICO No. 5	Curva de disminución de TPH para la concentración C3.....	73
GRÁFICO No. 6	Curva de disminución de TPH para la concentración C4.....	74
GRÁFICO No. 7	Comparación de la disminución de TPH con las diferentes concentraciones de inóculo.....	74
GRÁFICO No. 8	Curva de disminución de TPH para la muestra blanco.....	79
GRÁFICO No. 9	Curva de disminución de TPH para la concentración 1.....	79
GRÁFICO No. 10	Curva de disminución de TPH para la concentración 2.....	80
GRÁFICO No. 11	Curva de disminución de TPH para la concentración 3.....	80
GRÁFICO No. 12	Curva de disminución de TPH para la concentración 4.....	81

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	<i>Pleurotus ostreatus</i>	26
FOTOGRAFÍA No. 2	Producción de <i>Pleurotus ostreatus</i> en condiciones controladas.....	26
FOTOGRAFÍA No. 3	Mantenimiento de calor y humedad dentro del invernadero	35
FOTOGRAFÍA No. 4	Trabajos de remoción del suelo.....	40
FOTOGRAFÍA No. 5	Diferencia de color entre el suelo contaminado y no contaminado.....	40
FOTOGRAFÍA No. 6	Preparación de los inóculos.....	45
FOTOGRAFÍA No. 7	Disposición de las botellas para la incubación.....	45
FOTOGRAFÍA No. 8	Granulometría.....	47
FOTOGRAFÍA No. 9	Agitación y oxigenación de las muestras.....	50
FOTOGRAFÍA No. 10	Colocación de las fundas para incubación.....	55
FOTOGRAFÍA No. 11	Inoculación.....	56
FOTOGRAFÍA No. 12	Crecimiento en 24 horas.....	60
FOTOGRAFÍA No. 13	Crecimiento en 48 horas.....	60
FOTOGRAFÍA No. 14	Colonización efectiva en 10 días.....	61
FOTOGRAFÍA No. 15	Crecimiento en 24 horas.....	61
FOTOGRAFÍA No. 16	Crecimiento en 96 horas.....	62
FOTOGRAFÍA No. 17	Crecimiento inicial.....	62
FOTOGRAFÍA No. 18	Inico Dic/14/2009 – 20000 ppm.....	63
FOTOGRAFÍA No. 19	Final Dic/28/2009 – 20000 ppm – Réplica 1.....	64
FOTOGRAFÍA No. 20	Final Dic/28/2009 – 20000 ppm – Réplica 2.....	64
FOTOGRAFÍA No. 21	Día 1 Micelio de color oscuro.....	64
FOTOGRAFÍA No. 22	Día 4 Crecimiento de micelio blanco característico de <i>P. ostreatus</i>	65
FOTOGRAFÍA No. 23	Día 10 Colonización efectiva.....	65
FOTOGRAFÍA No. 24	Día 1 Inoculación usando la misma cepa de <i>P. ostreatus</i>	66
FOTOGRAFÍA No. 25	Día 7 Inoculación usando la misma cepa de <i>P. ostreatus</i>	66
FOTOGRAFÍA No. 26	Día 10 Inoculación usando la misma cepa de <i>P. ostreatus</i> ...	66
FOTOGRAFÍA No. 27	Día 14 Inoculación usando la misma cepa de <i>P. ostreatus</i> ...	66
FOTOGRAFÍA No. 28	Desarrollo miceliar en agar petróleo 60 días después.....	67
FOTOGRAFÍA No. 29	Desarrollo miceliar en agar petróleo 80 días después.....	67
FOTOGRAFÍA No. 30	Desarrollo miceliar en agar petróleo 100 días después.....	67
FOTOGRAFÍA No. 31	Tamaño inicial del micelio.....	68
FOTOGRAFÍA No. 32	Tamaño del micelio 100 días después.....	68
FOTOGRAFÍA No. 33	Crecimiento en medio líquido.....	68
FOTOGRAFÍA No. 34	Incubación 48 horas.....	70
FOTOGRAFÍA No. 35	Incubación 72 horas.....	70
FOTOGRAFÍA No. 36	Incubación 7 días.....	70
FOTOGRAFÍA No. 37	Aspecto del micelio en medio líquido.....	71
FOTOGRAFÍA No. 38	Coloración oscura de la muestra.....	77
FOTOGRAFÍA No. 39	Sustrato invadido.....	78

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Tabla No. 8: Resultados de los análisis de nutrientes.....	102
ANEXO No. 2	Tabla No. 9: Resultados de los análisis de textura del área a remediar.....	103
ANEXO No. 3	Cuadro No. 1: Resultados de los análisis de TPH de muestras esterilizadas.....	104
ANEXO No. 4	Cuadro No. 2: Resultados de los análisis de TPH de muestras no esterilizadas.....	105
ANEXO No. 5	Fotografías.....	106

INTRODUCCIÓN

Ecuador es un país exportador de petróleo. Las divisas obtenidas por la venta de petróleo crudo y sus derivados son la principal fuente de ingresos para nuestro país (17).

En la amazonia ecuatoriana las contaminaciones más severas se producen a causa de la extracción y manejo del petróleo. La contaminación por hidrocarburos y metales pesados es un problema que afecta gravemente a los suelos y la magnitud depende del área contaminada, las concentraciones y tipo de hidrocarburos, este es el caso del campamento Sacha 161 que sufrió un derrame de petróleo causando la contaminación que afectó una superficie de 1,25 hectáreas lo que equivale a 12500 m² y un volumen de aproximadamente 24000 m³ de suelo hoy inutilizable.

Entre las posibles técnicas de tratamiento aplicables para la descontaminación de un determinado espacio natural, merecen especial atención los procesos de degradación biológica, ya que son útiles para muchos tipos de residuos orgánicos (45).

Son procesos naturales que no suponen un impacto adicional sobre los ecosistemas y que se pueden realizar a un bajo coste. En muchos casos, pueden llevarse a cabo en el sitio donde se ha producido la contaminación, con lo cual se elimina la necesidad de transportar materiales peligrosos. Los tratamientos de biodescontaminación se basan en la acción de microorganismos o plantas sobre los agentes contaminantes (45).

Evidentemente, el proceso biológico para tratar los compuestos tóxicos, debe competir con los métodos existentes, en términos de economía y eficiencia. Los procesos biológicos tienen las ventajas de requerir inversiones moderadas de capital, bajo consumo de energía, ser ambientalmente seguros y no generar residuos (45).

Por su capacidad enzimática, los hongos constituyen uno de los grupos microbianos más importantes. El género *Pleurotus*, específicamente *Pleurotus ostreatus*, ha sido ampliamente estudiado con este propósito, está comprobada su eficacia en la biodegradación de algunos componentes químicos, y ha demostrado ser efectivo en la remoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y metales pesados de suelos contaminados con petróleo.

Se han realizado estudios en países productores de petróleo como es el caso de México donde se ha logrado que esta variedad de hongo *pleurotus ostreatus* crezca en suelos contaminados con hidrocarburos con una eficiencia considerable. También se ha estudiado esta variedad como biorremediador de suelos contaminados con metales pesados como es el caso de Puerto Rico, en el que se logró comprobar para el caso del plomo y cobre que en una cantidad mayor a 100 mg/Kg al cabo de dos semanas disminuyeron 7,1% y 8,4% respectivamente (35).

Las primeras investigaciones sobre biorremediación en nuestro país fueron realizadas en los laboratorios de biología de la Universidad Católica de Quito en la década de los ochenta, Petroecuador con un 50% de fondos provenientes de una ONG europea, hizo las primeras contrataciones de este tipo de servicios a un alto costo, constituyéndose éste en factor limitante para la aplicación de esta técnica de remediación.

En la Facultad de Ciencias de la ESPOCH se han realizado varias investigaciones relacionadas al cultivo de *Pleurotus ostreatus*, con fines de aprovechamiento de residuos lignocelulósicos, y desde hace tres años se realizan investigaciones en el campo de la biorremediación microbiana en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando bacterias nativas.

Aprovechando las experiencias en las investigaciones que se desarrollan en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias y el Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA), esta investigación demostró la eficacia del hongo *Pleurotus ostreatus* para biorremediar suelo contaminado con petróleo del Pozo Sacha 161.

La innovación de la presente investigación radicó en el uso de hongos para remediar suelos contaminados con petróleo, en el oriente ecuatoriano, por consiguiente, se mejoró los periodos de remediación por la característica de crecimiento acelerado del hongo.

Debido a su capacidad de desarrollarse sobre residuos agrícolas y forestales de bajo coste, además de que sus inóculos puedan ser producidos masivamente mediante técnicas convencionales de uso industrial habitual y por estar comprobada la eficacia en la biodegradación de algunos componentes químicos (66), es que el hongo *Pleurotus ostreatus* fue escogido para la realización de este estudio y demostrar además los beneficios de la biorremediación por medio del uso de este hongo como un método de limpieza de suelos contaminados con petróleo y que constituyen además una alternativa viable y económica.

En la presente investigación se determinaron los siguientes objetivos:

1. OBJETIVOS GENERALES:

Biorremediar suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo de la línea de flujo del pozo Sacha 161 utilizando el hongo "*Pleurotus ostreatus*".

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar químicamente la concentración de hidrocarburos derivados de petróleo en el suelo objeto de estudio.
2. Realizar pruebas en laboratorio para la determinación de la biorremediación utilizando el hongo *Pleurotus ostreatus*.
3. Determinar la eficacia del hongo *Pleurotus ostreatus* como agente biorremediador de los suelos contaminados con petróleo, del derrame de la línea de flujo del pozo Sacha 161 del oriente ecuatoriano.
4. Determinar la eficiencia de esta técnica como una alternativa apropiada para la biorremediación de suelos contaminados con petróleo.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 LA CONTAMINACIÓN POR HIDROCARBUROS

El suelo es uno de los elementos fundamentales del ambiente, y tampoco está libre del problema de la contaminación que afecta a la vida desde las formas más elementales, tales como los microorganismos, que intervienen en los ciclos básicos de materia y energía, hasta las especies más desarrolladas.

Una circunstancia agravante de este problema es la industria, sobre todo la contaminación producida por la industria química y petroquímica que se deposita sobre el terreno.

Las fugas y/o derrames de petróleo durante su producción, manejo y utilización ocasionan contaminación tanto en las zonas productoras como en las consumidoras, el deterioro de la vegetación, los microorganismos y los animales (3) (49) (6).

Químicamente, el petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos, es decir, de compuestos ricos en carbono e hidrógeno, aunque contiene otros elementos minoritarios como azufre, oxígeno y nitrógeno, así como trazas de metales.

Es compleja porque dada la capacidad del carbono de formar cuatro enlaces con otros átomos de carbono, se pueden organizar como cadenas o como ciclos.

Los alcanos son la familia más numerosa en el petróleo crudo y se conocen como parafinas, pueden ser lineales, ramificados o cíclicos y su longitud varía de 1 a 40 carbonos, aunque se ha logrado detectar cadenas de 60 carbonos.

Los alquenos son conocidos como olefinas y son una fuente valiosa de reactantes para la industria sintética.

Los hidrocarburos pueden ser alifáticos (saturados, insaturados y los correspondientes cíclicos). Los ciclos saturados se conocen como ciclo-alcanos, ciclo-parafinas o naftenos y son un componente minoritario del petróleo crudo. Los compuestos aromáticos son derivados del benceno, un anillo de seis carbonos unidos por tres enlaces sencillos y tres enlaces dobles alternados.

Los anillos pueden encontrarse fusionados entre ellos o sustituidos con cadenas alifáticas. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs) ó poli núcleo-aromáticos comprenden del 10 al 25% del petróleo crudo y son las fracciones más pesadas.

El contenido de azufre y de metales pesados afecta el valor del petróleo crudo y de sus fracciones, ya que los procesos de remoción son costosos (4).

La penetración del petróleo en el subsuelo está determinada por su viscosidad y, generalmente, es retenido en el horizonte superficial del suelo en donde se separa en tres fases: la volátil, que consta de los primeros cuatro n-alcanos, se fotooxida, volatilizándose en la atmósfera.

La fracción disuelta (compuestos de 5 a 17 carbonos) se difunde en la solución del suelo a través del agua presente; mientras que la fase sólida, integrada por los hidrocarburos de más de 18 carbonos, se adhiere o adsorbe en la matriz del suelo (36) (24). Estos últimos son los que poseen capacidad tóxica y carcinogénica.

Por su capacidad de adhesión y sorción de la materia orgánica constituyen el mayor problema potencial en suelos (42), los microorganismos y el hombre.

La vida media del petróleo en un suelo depende de las características de este último: proporción de materia orgánica y arcilla, actividad microbiana, temperatura, oxígeno,

fotooxidación, actividad enzimática y peso molecular del petróleo. Puede fluctuar desde unas cuantas semanas hasta más de diez años.

1.2 LA BIORREMEDIACIÓN

Un suelo agrícola es considerado contaminado si existe más de 2500 mg/kg de hidrocarburos totales del petróleo (25), 0.08 mg/kg de benzo (a) pireno y 1 mg/kg de hidrocarburos aromáticos policíclicos (48); dicho suelo puede presentar alteraciones de sus propiedades físicas, químicas y biológicas (59).

Existen consecuencias ambientales del derramamiento de crudo; en el caso del suelo, los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos, como evaporación y penetración, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida pueden ser procesos más o menos lentos lo que ocasiona una mayor toxicidad, además de tener una moderada, alta o extrema salinidad, lo que dificulta su tratamiento, debido a que altos gradientes de salinidad pueden destruir la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células, lo cual es letal para muchos microorganismos usados para el tratamiento de aguas y suelos contaminados (56).

La biorremediación es una alternativa biológica que puede realizarse in situ, y ex situ e involucra el uso de microorganismos para eliminar contaminantes orgánicos del suelo.

Los microorganismos alteran y destruyen las moléculas hidrocarbonadas en diversos metabolitos, llegando incluso, a derivarlos en dióxido de carbono, iones minerales y agua: compuestos inocuos para el ambiente (16) (51).

Las bacterias y los hongos son dos de los principales grupos frecuentemente involucrados en la oxidación y consecuente mineralización de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Las prácticas de biorremediación consisten en el uso de microorganismos como plantas, hongos, bacterias naturales o modificadas genéticamente para neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas en sustancias menos tóxicas o inocuas para el ambiente y la salud humana (50).

La biorremediación puede clasificarse de acuerdo al organismo que efectúe la degradación del compuesto xenobiótico.

La fitorremediación, es el uso de plantas para la remoción de contaminantes de suelo y aguas, es una técnica apropiada para la remoción de metales pesados.

Existen especies animales que actúan como agentes descontaminantes, ya que pueden desarrollarse en medios con fuerte toxicidad y poseen en su interior microorganismos capaces de retener metales pesados; tal es el caso de la lombriz de tierra *Lumbricus terrestris* que absorbe los contaminantes a través de los tejidos y los acumula en sus vías digestivas.

Las bacterias son las más empleadas en el proceso de biorremediación, aunque también se han empleado otros microorganismos como hongos, algas, cianobacterias y actinomicetes para la degradación de compuestos tóxicos en el suelo.

La biorremediación del suelo, puede ser dividida en estrategias in situ y ex situ. In situ corresponde a la biorremediación referente a tratamientos que no requieren excavación del suelo contaminado; ex situ es un método donde se excava el suelo o el material a tratar y se lo maneja en un sistema controlado como una celda de landfarming o algún tipo de biorreactor.

Las técnicas de biorremediación in situ presentan una mayor ventaja sobre las ex situ por el menor costo y la disminución de la generación de residuos a eliminar en la superficie.

La biorremediación in situ es más aplicada y utiliza microorganismos autóctonos que en el suelo pueden degradar un gran número de constituyentes del lodo, pero su eficacia y su población son afectadas en función de la concentración de los contaminantes (11).

La reintroducción de microorganismos aislados de un sitio contaminado ayuda a resolver este problema ya que los microorganismos pueden degradar los constituyentes y tienen una gran tolerancia a la toxicidad.

La biorremediación es una tecnología de control de contaminación que utiliza sistemas biológicos para catalizar la degradación o transformación de compuestos tóxicos a formas menos dañinas.

Uno de los objetivos del uso de la biorremediación es aumentar y mejorar la biodegradación por los organismos nativos (microflora), lo que se conoce como biorremediación intrínseca, o por medio de la adición de organismos (bioaumentación) para complementar el proceso.

A diferencia de otras tecnologías convencionales, como la incineración, la biorremediación se puede llevar a cabo en el lugar mismo y aunque el número de compuestos tóxicos que esta tecnología puede manejar es limitado, es costo-efectiva cuando se aplica.

1.2.1 MÉTODOS DE BIORREMEDIACIÓN

Los métodos más empleados en biorremediación son:

1. **BIOFILTRACIÓN.-** El aire contaminado pasa a biorreactores donde la flora microbiana degrada los contaminantes volátiles en dióxido de carbono, agua y biomasa.
2. **BIOVENTING.-** Proceso de biorremediación in situ que consiste en la ventilación forzada del suelo mediante la inyección de O₂ en la zona no saturada mediante pozos de inyección; la aireación favorece la degradación de los hidrocarburos

por volatilización y migración de la fase más volátil del contaminante, y por biodegradación, ya que al incrementar la oxigenación del suelo se estimula la actividad microbiana.

3. **BIOSPARGING.-** Método in situ que combina el efecto de la ventilación con la utilización de microorganismos autóctonos para degradar compuestos orgánicos absorbidos por el suelo en la zona saturada. En éste el aire y los nutrientes se inyectan en la zona saturada para mejorar la actividad de los microorganismos presentes.

4. **BIOPILAS.-** Método de biorremediación ex situ en condiciones no saturadas, se fundamenta en la reducción de la concentración de contaminantes derivados del petróleo de suelos excavados mediante el uso de la biodegradación. La técnica consiste en la formación de pilas de material biodegradable de dimensiones variables formadas por suelos contaminados y materia orgánica, compost, en esta se aplica una aireación activa volteando la pila, o pasiva por tubos de aireación.

5. **ATENUACIÓN NATURAL.-** Técnica de biorremediación in situ de bajo costo, su característica principal es la utilización de procesos físico-químicos de interacción contaminante-suelo donde los procesos ocurren de forma natural, se conocen también como procesos de biotransformación natural (11).

1.3 APLICACIONES DE HONGOS EN TRATAMIENTOS DE BIODESCONTAMINACIÓN

Aunque buena parte de los estudios de descontaminación biológica se han centrado en bacterias por la facilidad que ofrecen para estudiar sus vías metabólicas y llevar a cabo construcciones genéticas que permitan degradar específicamente determinados contaminantes, la capacidad de los hongos para transformar una gran variedad de compuestos orgánicos hasta CO₂ y H₂O ofrece un potencial indiscutible para su utilización en procesos de tratamiento de contaminaciones.

Ese potencial radica fundamentalmente en las características de su sistema enzimático y en su vigoroso crecimiento que les permite, a través del desarrollo de su micelio, colonizar diferentes tipos de sustratos y acceder a los compuestos que constituyen las contaminaciones más frecuentes de los suelos.

El elevado valor de la relación superficie/volumen celular de los hongos filamentosos los convierte en eficaces degradadores en determinados nichos como los suelos contaminados.

Por otra parte, los hongos tienen una capacidad muy notable para acumular metales pesados como cadmio, cobre, mercurio, plomo y zinc, lo que está demostrado por los aislamientos realizados en minas de cobre, zinc o plomo.

Los hongos tienen muchas ventajas que facilitan su uso en biorremediación, por ejemplo: los hongos están presentes en sedimentos acuáticos y en hábitats terrestres, además poseen ventajas sobre las bacterias por el hecho de que sus hifas pueden penetrar el suelo contaminado y producir enzimas extracelulares que degradan los contaminantes.

Se ha demostrado que los hongos blancos de putrefacción tienen la capacidad de atacar un amplio espectro de hidrocarburos poliaromáticos (HAPs).

Los HAPs son compuestos orgánicos hidrofóbicos con alto grado de mutagenicidad y toxicidad que han sido liberados en el medio ambiente a gran escala; algunos ejemplos son fenantreno, fluoreno y antraceno.

Los hongos son además, muy buenos en la acumulación de metales pesados como cadmio, cobre, mercurio, plomo y zinc (65).

1.4 HONGOS LIGNINOLÍTICOS Y COMPUESTOS XENOBIÓTICOS

Los hongos ligninolíticos han desarrollado un sistema enzimático único y no específico que funciona en el ambiente extracelular. El mecanismo del sistema degradador de

lignina está basado en la producción de radicales libres.

Este mecanismo permite que estas enzimas sean catalíticamente activas sobre una gran diversidad de sustratos orgánicos. La enorme diversidad estructural de los contaminantes que son degradados por estos hongos, les confiere un uso potencial en biorremediación.

Estos hongos han sido efectivos en la degradación de una diversidad de contaminantes ambientales peligrosos (Tabla 1) (20).

TABLA No. 1. COMPUESTOS XENOBIÓTICOS DEGRADADOS POR CULTIVOS DE HONGOS DE LA PODREDUMBRE BLANCA.

<i>Compuesto xenobiótico</i>	<i>Especie^a</i>	<i>Referencia</i>
Fenoles clorinados		
Pentaclorofenol	Pc, Ps, Po, Th, Cs	<i>Mileski y cols., [23]</i>
Triclorofenol	Pc	<i>Field y cols., [10]</i>
Diclorofenol	Pc	<i>Field y cols., [10]</i>
Cloroguayacoles	Pc	<i>Field y cols., [10]</i>
Bifenilos policlorinados		
Aroclor 1254	<i>Pc, Tv, Pb, Fg</i>	Eaton, [24]
Tetracloro bifenilo	<i>Pc</i>	Bumpus y col., [25]
Colorantes		
Colorantes azo	<i>Pc, Po, Tv</i>	Cripps y cols., [33]; Spadaro y cols., [34]
Colorantes poliméricos	<i>Pc</i>	Glenn y Gold, [35]
Cristal violeta	<i>Pc</i>	Bumpus y Brock, [36]
Violeta ácido 7	<i>Tv</i>	Zhang y Yu, [37]

FUENTE: MENSAJE BIOQUÍMICO, VOL. XXX (2006)

Pc, Phanerochaete chrysosporium; Ps, Phanerochaete sordida; Po, Pleurotus ostreatus; Th, Trametes hirsuta; Cs, Ceriporiopsis subvermispora; Tv, Trametes versicolor; Pb, Phlebia brevispora; Fg, Funalia gallica; Ba, Bjerkandera adusta; Cl, Chrysosporium lignosum.

1.5 LACASA

Las fenol oxidasas son enzimas que catalizan la oxidación de un amplio espectro de compuestos fenólicos y aminas aromáticas utilizando el oxígeno molecular como aceptor de electrones, reduciéndolo a agua (63).

La lacasa es una fenol oxidasa que debe su nombre a que fue descubierta, hace más de un siglo, en el árbol japonés de la laca: *Rhus vernicifera* (70). Esta enzima contiene átomos de cobre y se encuentra ampliamente distribuida en las plantas superiores, diversas clases de hongos y algunas bacterias (32). Todas las lacasas son glicoproteínas extracelulares (55) con pesos moleculares entre 60 y 80 kDa, y del 15 al 20% de su peso molecular esta dado por carbohidratos (63).

La lacasa fúngica (bencendiol:oxígeno oxidorreductasa), es una fenol oxidasa extracelular producida por el micelio de basidiomicetos, ascomicetos y deuteromicetos (13). Los mejores productores de esta enzima son los hongos ligninolíticos (39) (40).

Bioquímicamente, la lacasa es una enzima que oxida una variedad de compuestos aromáticos. Cataliza la remoción de un electrón y un protón de hidroxilos fenólicos o de grupos amino aromáticos, para formar radicales libres fenoxilo y radicales amino, respectivamente. Este grupo de enzimas, posee cuatro átomos de cobre en su estado de oxidación que les confiere una coloración azul.

Esta enzima oxida no solamente ácidos fenólicos y metoxifenólicos, sino que también los descarboxila (2) y ataca sus grupos metoxilo mediante la desmetilación (40) o desmetoxilación. Todas estas reacciones pueden representar un paso importante en la transformación inicial de la lignina (52).

La lacasa también reacciona con polifenoles y otros compuestos aromáticos derivados de la lignina, los cuales, pueden ser polimerizados o despolimerizados, o incluso actuar como mediadores redox de bajo peso molecular (14).

La utilización de sistemas mediador-lacasa es una alternativa promisoría para procesos biotecnológicos con aplicaciones ambientales. Entre ellos, los de blanqueo de la pulpa de papel (14), la decoloración de colorantes textiles (57) (60) y la oxidación de hidrocarburos polinucleoaromáticos (67).

1.6 OXIDACIÓN BIOCATALÍTICA DE HIDROCARBUROS POLIAROMÁTICOS

Los hidrocarburos poliaromáticos (HPAs) son componentes del petróleo crudo, la creosota y el carbón. Compuestos ampliamente distribuidos en el ambiente. La mayoría de la contaminación por HPAs está originada por el uso extensivo de combustibles fósiles como fuente de energía. Su alta persistencia en el ambiente se debe a su alta hidrofobicidad, lo que hace muy lenta su biodegradación microbiana.

Su remoción del ambiente es prioritaria debido a que muchos de los HPAs tienen propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas (47).

Compuestos como el pireno, benzo(a)pireno, acenafteno, fenantreno, antraceno y fluorantreno pueden ser oxidados por enzimas como la lacasa. La habilidad de estas enzimas para oxidar los HPAs depende de la naturaleza de cada compuesto.

El PI es una medida (electrón-Volts) de la energía requerida para sustraer un electrón del orbital molecular más alto de un compuesto. La extracción de un electrón del sistema π de los compuestos aromáticos genera un radical catiónico. La capacidad de los HPAs para formar radicales catiónicos se relaciona con su PI, que a su vez, depende de la distribución de carga de los electrones π del compuesto.

1.7 IMPORTANCIA DE LOS HONGOS EN LA NATURALEZA

Debido a que los hongos viven de la descomposición de la materia orgánica en sus diversas formas, incluyendo la basura, hojarasca y otros sustratos, estos organismos

constituyen la clave para la reincorporación de los materiales orgánicos en el suelo, favoreciendo así la formación o el enriquecimiento de tales suelos.

Existen especies de hongos que son parásitas, unas en animales y otras en vegetales. Las primeras constituyen por su importancia toda una especialidad en la medicina, ya que son muchas las especies de hongos que atacan al hombre, tales como las llamadas “tiñas” o el “pie de atleta”.

Sin embargo, ninguno de los hongos macroscópicos considerados como comestibles, son capaces de producir ninguna enfermedad en el hombre.

Los basidiomicetos que causan la podredumbre blanca de la madera (que corresponde aproximadamente al 96% de las Poliporáceas), son las especies con las características más adecuadas para ser utilizadas en diferentes procesos biotecnológicos, incluidos los de biodescontaminación.

En este sentido, la investigación de la ecología y fisiología de dichos hongos juega un papel relevante en el desarrollo de biotecnologías emergentes como la obtención y blanqueo enzimático de pulpas, decoloración de efluentes industriales (papeleros, cerveceros, azucareros), degradación de contaminantes orgánicos y biotratamiento de colorantes industriales.

Los hongos de podredumbre blanca poseen la capacidad de degradar mayoritariamente la lignina, un polímero polifenólico heterogéneo que es uno de los tres componentes principales de los sustratos lignocelulósicos.

Pleurotus ostreatus es un hongo comestible, al respecto se han realizado muchas investigaciones relacionadas con su valor nutricional y su importancia económica en la industria alimentaria.

Su cultivo ha adquirido relevancia en esta industria alrededor del mundo en los pasados años y continúa en expansión, *P. ostreatus* es el tercer hongo cultivado más importante para propósitos alimentarios.

Nutricionalmente es rico en proteínas, fibra, hidratos de carbono, vitaminas y minerales, además de tener un sabor y olor únicos (18).

En el área de la medicina se ha encontrado que el género *Pleurotus* lleva a cabo actividades antibacteriales, antivirales, antitumorales, hematológicas e hipocolesterolemica (18).

1.8 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL HONGO

Es fundamental que el hongo que se va a cultivar se identifique correctamente desde el punto de vista taxonómico, ya que de ello dependerán las técnicas que se utilizarán en el cultivo.

Nombre científico: *Pleurotus ostreatus* var. *Florida*

Nombres comunes: setas, hongo ostra, orejas blancas, orejas de palo, orejas de patacas, orejas de cazahuate, orejas de izote.

Sistemática: la identificación de las distintas especies de hongos es necesaria para decidir si son o no apropiados para el consumo (54).

REINO: Fungi

SUBREINO: Fungi Superior

CLASE: Basidiomycetos

SUBCLASE: Eubasidiomycetos

ORDEN: Agaricales

FAMILIA: Pleurotuaceae

GÉNERO: *Pleurotus*

ESPECIE: *Ostreatus*

VARIEDAD: *Florida*



FOTOGRAFÍA No. 1: *Pleurotus ostreatus*



FOTOGRAFÍA No. 2: PRODUCCIÓN DE *Pleurotus ostreatus* EN CONDICIONES CONTROLADAS

1.9 CARACTERÍSTICAS DEL *Pleurotus* sp

La producción de este hongo es el resultado de la utilización de los residuales de fácil biodegradación, la cual en un ambiente particular requiere de la presencia de los microorganismos apropiados, que en muchas ocasiones pueden consistir en una comunidad microbiana compleja.

Para que esto suceda el ambiente debe ser apto tanto para el crecimiento de los microorganismos como para la producción de reacciones químicas de transformación en velocidades significativas.

Hay que tener en cuenta factores que son muy importantes en los que se citan: características del sustrato, concentración de nutrientes, temperatura, pH, humedad, entre otros.

Las ventajas de cultivar *Pleurotus*, con respecto a otros hongos son las siguientes:

- Son agentes biológicos capaces de convertir materia orgánica no comestible y de bajo valor económico en un producto con un importante valor agregado,
- No se requiere de sustratos preformados. Se pueden cultivar en sustratos sin fermentar previamente.
- Fructifica bien en residuos con bajo contenido de nitrógeno produciendo frutos con alto contenido de ese elemento.
- Se caracteriza por un rápido crecimiento micelial que facilita una colonización activa de los residuos lignocelulósicos y otro tipo de residuos contaminados.
- Los requerimientos de temperatura y humedad no son estrechos e inflexibles.
- Pueden tolerar altas concentraciones de CO₂ en la atmósfera ambiental.
- La cosecha de cuerpos fructíferos es sencilla.
- El sustrato remanente después de finalizado el ciclo constituye un residuo con un alto grado de descontaminación.

1.10 GENERALIDADES SOBRE SU CULTIVO

El cultivo de esta seta es posible realizarlo con diferentes técnicas, pero en todas ellas lo fundamental consiste en sembrar el micelio sobre un sustrato húmedo (casi siempre pasteurizado), incubarlo a 20-25° C, mientras permanece cubierto con plástico y, por último, mantenerlo descubierto en sitios muy húmedos y frescos, generalmente a, menos de 15° C, hasta que salgan las setas.

1.10.1 SIEMBRA E INCUBACIÓN

La siembra consiste en mezclar el micelio con el sustrato ya preparado, de un modo uniforme. La cantidad de micelio comercial varía entre 1 y 4 % del peso húmedo. A mayor cantidad el desarrollo del hongo será más rápido y abundante pero la temperatura también será mayor, lo que perjudicará al desarrollo del micelio.

El micelio se prepara en laboratorio, germinando las esporas en placas con agar-maltosa u otros medios de cultivo. Después se hace crecer sobre granos de cereales esterilizados, y una vez colonizados se realiza la incubación en un ambiente cerrado para evitar la contaminación o la deshidratación y para mantener una humedad del 85 %.

La duración de esta etapa puede variar, pero en general es de cuatro semanas, tiempo que tarda el micelio en cubrir toda la caja (el sustrato se torna completamente blanco) y en empezar a aparecer unos puntos pequeñitos y en cantidad llamados primordios (las primeras manifestaciones de los cuerpos fructíferos de las setas) ya que indican que es el momento de llevarlas a fructificación (54).

1.10.2 FRUCTIFICACIÓN

Una vez que el sustrato es invadido por el micelio del hongo hay que cambiar las condiciones del cultivo, proporcionando un ambiente propicio y adecuado para lograr una excelente producción.

Se aumenta la humedad relativa, para lo cual se cierran las ventanas a fin de evitar la deshidratación y mantener la humedad por encima del 90 %, igualmente, se proporcionan condiciones de semipenumbra para inducir la formación de los cuerpos fructíferos (setas).

Durante el período de fructificaciones se pretende mantener temperaturas máximas de 20 °C a 22 °C, humedad del 90 % al 100 % y semipenumbra (54).

1.11 CONDICIONES AMBIENTALES PARA EL CRECIMIENTO DE HONGOS

Las condiciones ambientales óptimas para el crecimiento de hongos se las miden a través de factores físicos o químicos, como temperatura, humedad, pH, etc.; sin embargo hay otro tipo de condiciones ambientales extremadas tales como una escasez de nutrientes esenciales.

1.11.1 TEMPERATURA

La mayoría de los hongos son mesófilos; crecen a temperaturas moderadas en un intervalo de 10 a 40°C. Para fines prácticos, la mayoría de los hongos crecen bien a temperatura ambiente. Mientras que las temperaturas de 30 a 37°C, que por lo común son idóneas para las bacterias, son inadecuadas para muchos hongos.

Pocos hongos son termófilos y crecen en el intervalo de 20 a 50°C, con una temperatura óptima de (o cerca de) 40°C y un límite máximo de 60 a 62°C (54).

1.11.2 CONCENTRACIÓN DE IONES HIDRÓGENO

Las respuestas de los hongos al pH son en gran medida por otros factores no relacionados, sin embargo, en el laboratorio muchos hongos crecen en un intervalo de pH de 4,5 a 8,0., y muestran un amplio intervalo de pH óptimo de 5,5 a 7,5.

Una buena parte de la información acerca del pH proviene de estudios sobre las enzimas de los hongos que por lo general tienen un pH óptimo entre 5,0 y 5,5.

Muchos otros factores son afectados por el pH, incluyendo la permeabilidad de la membrana y el grado de disociación de las moléculas en iones. Por lo tanto, es posible que un hongo sea incapaz de absorber nutrientes esenciales a un cierto valor de pH, o bien encuentre niveles tóxicos de compuestos, dependiendo del grado de toxicidad en la forma disociadas o en la no disociada.

Además, los hongos a menudo alteran el pH del medio en el que crecen y los hacen por:

- Absorción selectiva e intercambio de iones,
- Producción de CO₂ o NH₃,
- Producción de ácidos orgánicos

En cuanto al crecimiento a niveles extremos de pH, hay varios hongos acidófilos o tolerantes al ácido, pero sólo hay unos cuantos (si acaso los hay) verdaderamente basófilos (54).

1.11.3 AIREACIÓN

La mayoría de los hongos son aerobios estrictos; requieren de oxígeno cuando menos en pequeñas cantidades para su crecimiento.

1.11.4 HUMEDAD

Existen varias formas de definir la disponibilidad de agua para un organismo. Los micólogos a menudo se han referido a humedad relativa (HR) en equilibrio, en cuyo caso el 70% de HR es, para fines prácticos, el límite inferior para el crecimiento de los hongos, aunque algunos crecen con mucha lentitud a una HR menor de 65%. Los hongos muestran un comportamiento muy variado con respecto a la disponibilidad de agua, pero en general son más tolerantes a la escasez de agua que otros organismos (54).

1.11.5 LUZ

La parte visible del espectro (longitudes de onda entre 380 y 729 nm) tiene poco efecto, hasta donde se sabe, en el crecimiento vegetativo de los hongos, aunque puede tener efectos importantes en la esporulación.

La radiación ultravioleta en la región de 200 – 300 nm tiene efectos mucho más pronunciados en el crecimiento vegetativo. Esta radiación produce mutaciones y daño letal al resultar afectado el DNA.

A diferencia del crecimiento vegetativo, el desarrollo de las estructuras reproductoras sexuales y asexuales es a menudo afectado por la luz (54).

TABLA No. 2: RANGO ÓPTIMO DE LOS PRINCIPALES FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Pleurotus*

PARÁMETRO	RANGO
Temperatura	20 -26°C
Humedad relativa	85 – 90%
Humedad del sustrato	50 – 60%
Luz	Suficiente para leer, al menos durante una hora diaria
Renovación del aire	6 veces el volumen de la sala por hora

1.12 MARCO LEGAL

Con el fin de regular las actividades hidrocarburíferas en el Ecuador, susceptibles de producir impactos ambientales en el área de influencia directa, el Gobierno expide según decreto ejecutivo N° 2982, publicado en el registro oficial N° 766 del 24 de agosto de 1995 el “Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador”,

dicho reglamento fue reformado según registro oficial 265 el 13 de febrero del 2001, tomando el nombre de “Reglamento Sustitutivo al Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador” (Decreto N° 1215) (RAOHE), actualmente vigente, en el que se incluyen normas técnicas ambientales, parámetros y límites permisibles, formatos, métodos y definiciones de los términos utilizados en la industria hidrocarburífera (25).

Los límites permisibles aplicables a suelos contaminados con hidrocarburos se encuentran en la Tabla 6 del RAOH, Decreto 1215, de acuerdo al uso posterior a darse al suelo remediado, enlistados en la siguiente tabla. (25).

TABLA No. 3: 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.

PARÁMETRO	EXPRESADO EN	UNIDAD	USO AGRÍCOLA	USO INDUSTRIAL	ECOSISTEMAS SENSIBLES
Hidrocarburos totales de Petróleo	TPH	mg/Kg	<2500	<4000	<1000
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	HAPs	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

Fuente: Tabla 6 - RAOHE, Decreto Ejecutivo N° 1215, Registro Oficial 265 del 13- 02- 2001.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se desarrolló en los laboratorios de Biotecnología de la Facultad de Ciencias y en el laboratorio de la Facultad de Agronomía pertenecientes a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo de la ciudad de Riobamba ubicada a 2756 m.s.n.m. con una temperatura promedio de 13 °C - 17 °C, humedad relativa promedio de 30 – 40% y una presión atmosférica de 540 mm Hg.

Los análisis físico-químicos del suelo se realizaron en los laboratorios del CESTTA de la ESPOCH.

Las muestras de suelo fueron tomadas de la línea de flujo del pozo Sacha 161:

2.1.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

Ubicación de la zona: El Cantón Joya de los Sachas está ubicado al noroeste de la Provincia de Orellana, formando parte de la cuenca del río Napo.

Superficies:

Urbana	440,7 Has
Rural	119.848 Has
Total	120.560 Has.
Altitud:	270 m.s.n.m.

Límites:

Norte: Provincia de Sucumbíos
Sur: Cantón Puerto Francisco de Orellana
Este: Provincia de Sucumbíos
Oeste: Cantón Puerto Francisco de Orellana

Ubicación del Pozo Sacha 161: tiene la siguiente ubicación geográfica:

Longitud: 76° 52' 57" W

Latitud: 0° 18'21" S

Provincia: Orellana

Cantón: La Joya de los Sachas

Geo-referencia: El Pozo Sacha 161 se encuentra ubicado a 5,0 km al noroeste de la ciudad La Joya de los Sachas, a 5 minutos de la vía principal a la ciudad de Shushufindi.

Localización cartográfica: 290480E/9969870N

Superficie sujeta a remediación:

1,25 hectáreas.

Para las pruebas con suelo contaminado se preparó un espacio con paredes y techo de plástico de invernadero, la temperatura y humedad se controló utilizando una olla con agua y calentándola con una hornilla eléctrica.

La luz se controló cubriendo el invernadero con plástico negro.



FOTOGRAFÍA No. 3: MANTENIMIENTO DE CALOR Y HUMEDAD DENTRO DEL INVERNADERO

2.2 MATERIALES UTILIZADOS

1. El suelo utilizado en la investigación de biorremediación fue utilizado para pastoreo por los dueños del terreno (Familia Merizalde). Luego del derrame se observa pérdida de biodiversidad (flora y fauna).
2. La cepa de *P. ostreatus* var. Florida que se utilizó para este estudio, fue donada por el laboratorio de la Facultad de Agronomía de la ESPOCH, dicha cepa a su vez, proviene de la cepa CP 184 de *Pleurotus ostreatus* var. florida donada por el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial de la Universidad de Oriente de Santiago de Cuba a la ESPOCH.
3. La tusa de choclo (*Zea mays*) proviene del mercado del cantón Sacha.
4. La melaza es un subproducto de la producción de azúcar y es la principal fuente de energía de los microorganismos que participan en la fermentación. La melaza utilizada en este estudio fue adquirida en la Plaza Oriental de la ciudad de Riobamba.
5. La levadura utilizada fue Lavadura granulada activa seca Fleischman.
6. El agua crea las condiciones favorables para el desarrollo de la actividad y reproducción microbiológica, ayuda además a homogeneizar la humedad de todos los ingredientes que componen el sustrato. Para la elaboración de los agares, se utilizó agua destilada,

mientras que para la humectación de los suelos se utilizó agua corriente, proveniente de la vertiente natural ubicada dentro de los predios de la ESPOCH.

2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

2.3.1 VARIABLES DE CONTROL

TABLA No. 4: VARIABLES DE CONTROL

VARIABLES DEPENDIENTES
TPHs
Masa fúngica

VARIABLES INDEPENDIENTES
pH
Humedad
Temperatura

2.3.2 RESPUESTAS EXPERIMENTALES

En el presente proyecto, la respuesta experimental se midió en función de la reducción de la concentración de TPH en el suelo, utilizando el hongo *Pleurotus ostreatus*, con el fin de cumplir con los parámetros establecidos en el Reglamento Sustitutivo del Reglamento Ambiental para las operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador Decreto N° 1215.

2.3.3 ANÁLISIS DE DATOS

Se utilizó el análisis de varianzas ADEVA para determinar si existen diferencias significativas en los resultados.

Para la determinación de las concentraciones más favorables se utilizó la Prueba de Tukey.

2.4 ESQUEMA DE DISTRIBUCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LABORATORIO

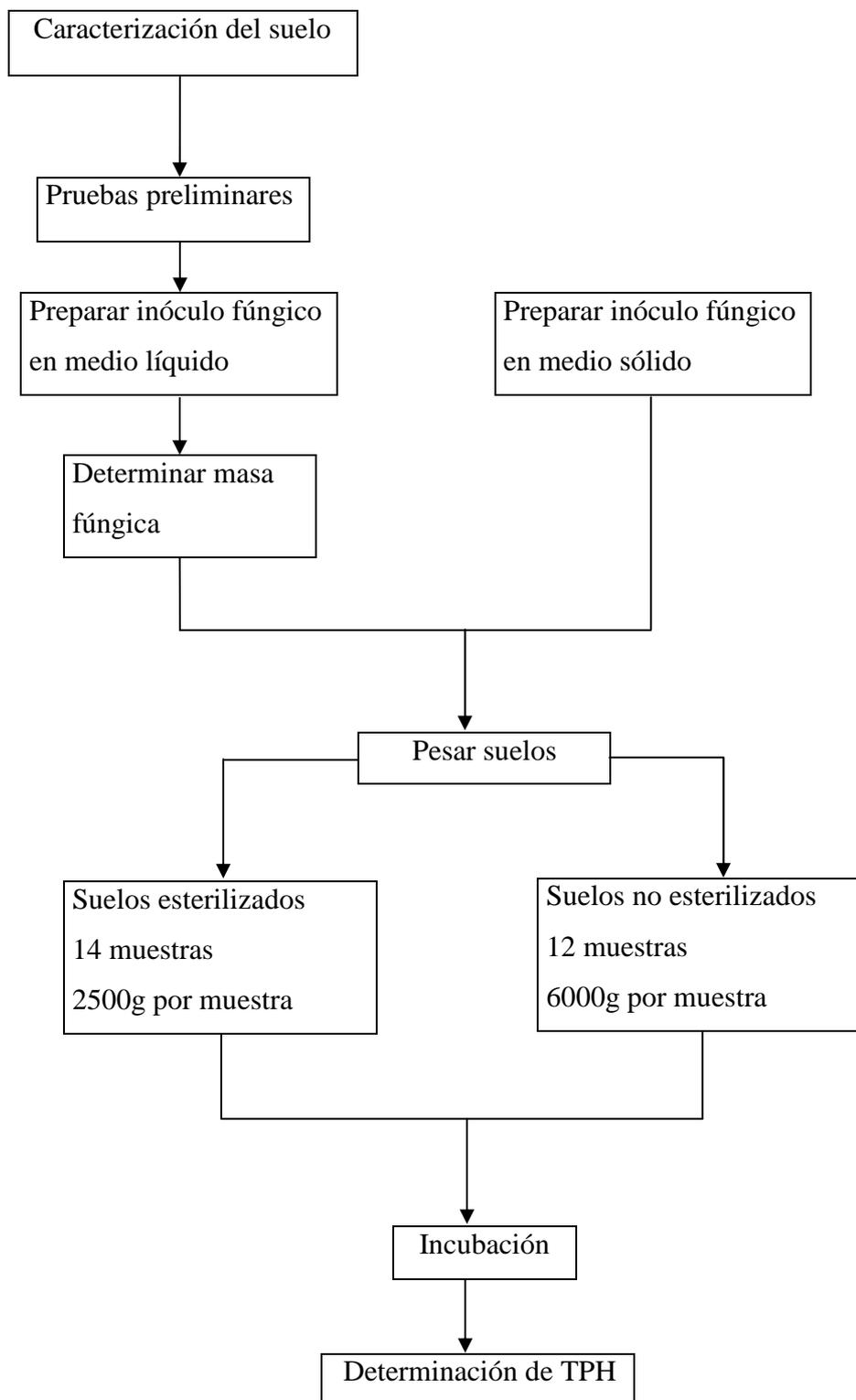
- Concentración del inóculo (*Pleurotus ostreatus*): **C1, C2, C3, C4**.
- Réplicas: **R1, R2, R3**.

TABLA No. 5: DISTRIBUCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUELO

C1:	R1	R2	R3
C2:	R1	R2	R3
C3:	R1	R2	R3
C4:	R1	R2	R3

2.5 DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO PLANTEADO

GRÁFICO No. 1: DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO PLANTEADO



2.6 TOMA DE MUESTRAS Y CARACTERIZACIÓN DEL SUELO

En la toma de muestras para la caracterización del suelo se aplicó el Procedimiento Específico de Ensayo PEE/LAB-CESTTA/02 Muestreo de suelos que el LAB-CESTTA utiliza en su sistema de Calidad.

2.6.1 MUESTREOS EN CALICATAS

Se realizó las excavaciones relativamente grandes para remover secciones de suelo en las cuales fue necesario realizar exámenes detallados de las características del mismo. Este tipo de excavaciones que revelan el perfil del suelo se llaman calicatas.

1. Antes de realizar la excavación se, aseguró que el terreno se encuentre libre de líneas de tensión, cañerías, etc., tanto debajo como por encima de la superficie.
2. Se procedió abrir 21 calicatas de aproximadamente 1 m de ancho y cerca de 2 por debajo de la zona de muestreo seleccionada y limpia.
3. Se usó una pala para quitar de 2 a 5 cm del espesor de la pared vertical del suelo de donde se va a tomar la muestra.
4. Se tomó la muestra usando el muestreador más adecuado a las necesidades de ensayo.
5. Para la toma de muestras usadas en las pruebas de laboratorio se recolectaron aproximadamente 500 libras de suelo contaminado.
6. Las muestras fueron tomadas seleccionando el suelo más contaminado, lo que se evidenció por la coloración oscura del mismo. Las muestras fueron empacadas en fundas de plástico para ser transportadas a los laboratorios de Biotecnología de la ESPOCH en un lapso de 48 horas.



FOTOGRAFÍA No. 4: TRABAJOS DE REMOCIÓN DEL SUELO



FOTOGRAFÍA No. 5: DIFERENCIA DE COLOR ENTRE EL SUELO CONTAMINADO Y NO CONTAMINADO

2.6.2 MUESTREO DE SUELOS EN INVESTIGACIÓN

Inicialmente, se extendió el suelo a tratar y se homogeneizó utilizando una pala. Se determinó los TPH antes de la inoculación tomando una muestra compuesta de toda la muestra de suelo. Después de la inoculación, se determinó los TPH semanalmente.

2.7 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUELO

Una forma adecuada de esterilizar suelos es por esterilización fraccionada, debido a que una primera esterilización matará los microorganismos, pero algunos de ellos podrían resistir por diferentes razones, por eso se realiza la segunda esterilización 24 horas después, debido a que al bajar la temperatura, los microorganismos aun presentes vuelven a germinar pero pierden su resistencia por lo que serían eliminados, y luego se realiza una tercera esterilización para asegurarnos que todos han sido eliminados.

El suelo esterilizado se usó para las pruebas utilizando un inóculo fúngico en medio líquido y garantizar que la variación de TPH es producto únicamente de la actividad de *P. ostreatus*.

Las demás pruebas se realizaron utilizando suelo no esterilizado, para determinar la variación de TPH producto de la actividad de *P. ostreatus*, conjuntamente con la de la flora bacteriana nativa presente en las muestras.

1. Para las pruebas con inóculo líquido se pesó y enfundó una cantidad determinada de suelo esterilizado para cada ensayo.
2. Diariamente, se controló la temperatura dentro del invernadero. No se controló la humedad puesto que esta se mantuvo estable dentro de la funda.
3. Semanalmente, se tomó una pequeña muestra de cada suelo y se dejó secar a temperatura ambiente para la determinación de los TPH.

4. Para las pruebas utilizando sustrato en medio sólido, las muestras de suelo no esterilizado se pesaron y distribuyeron en canastillas plásticas.
5. Diariamente, se controló la temperatura dentro del invernadero, aumentando o disminuyendo la circulación de aire.
6. La humedad se controló diariamente por adición de agua.
7. Semanalmente, se tomó una pequeña muestra de cada suelo y se dejó secar a temperatura ambiente para la determinación de los TPH.
8. Los pesos y volúmenes se determinaron utilizando una balanza y un recipiente de forma regular.

2.8 MÉTODOS

TABLA No. 6: MÉTODOS DE ANÁLISIS

PARÁMETRO	MÉTODO
pH	Potenciométrico EPA 9545 D
Humedad	Potenciométrico
Temperatura	Termómetro calibrado APHA 2550 B, Ed.21
Peso	Gravimétrico
Masa fúngica	Cultivos en agar selectivo y método gravimétrico
Volumen	Métrico
Densidad	Gravimétrico
Hidrocarburos Totales	TNRCC 1005, Junio 2001 EPA Method No 1311 Ed.1, 1992

CAPÍTULO III

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 REACTIVACIÓN DEL MICELIO *Pleurotus ostreatus* var. florida

Los hongos necesitan nutrientes ricos en carbono, por esta razón se escogió el agar PDA debido a su alto contenido de dextrosa (fuente de C).

3.1.1 MATERIALES, EQUIPOS, REACTIVOS

- Botellas de gatorade con tapa
- Cajas petri
- Asa para inoculación
- Mechero de alcohol
- Cepas de *P. ostreatus* var. florida.
- Balanza digital (Camry)
- Autoclave (Tuttnauer 2540 MK)
- Cámara de flujo laminar (Streamline EN 1822 1 Class H13)
- Estufa de cultivo (Memmert)
- Agua destilada
- Agar PDA (Difco)
- Cloranfenicol (cápsula)

3.1.2 PROCEDIMIENTO

- a. Preparar 200 ml de agar PDA y esterilizar en autoclave: 20 minutos a 121⁰C.

- b. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- c. A 45°C añadir cloranfenicol: 1 cápsula/500 ml.
- d. Distribuir el agar en las cajas Petri trabajando en condiciones asépticas.
- e. Con un asa inocular el agar colocando el micelio hacia arriba.
- f. Sellar las cajas e incubar a 28°C.

3.2 PREPARACIÓN DE INÓCULOS

El “sustrato” es el material sobre el cual crece el micelio. Las propiedades físico-químicas del sustrato son las que determinan que hongos o que microorganismos pueden crecer en él. Como sustrato se utilizó granos de trigo perlado.

3.2.1 MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

- Recipiente pequeño de plástico
- Vaso desechable
- Botellas de gatorade con tapa
- Espátula
- Cepa de *P. ostreatus* var. Florida
- Trigo perlado
- Balanza digital
- Cámara de flujo laminar
- Mechero de alcohol
- Estufa de cultivo
- Agua destilada

3.2.2 PROCEDIMIENTO

- a. Escoger los granos de trigo, retirando las basuras, ramas, piedras y otros elementos presentes en la muestra que se va a preparar.

- b. Remojar el trigo en agua caliente durante 10 minutos removiéndolo para facilitar la flotación de basuras, enjuagar con agua caliente. Repetir el paso dos veces.
- c. Pesar 150g de trigo para cada botella que se va a utilizar.
- d. Esterilizar en autoclave (20 minutos a 121 °C)
- e. En la cámara de flujo laminar, preparar los inóculos cortando la cepa con una espátula en porciones pequeñas, las que serán colocadas luego en cada botella.



FOTOGRAFÍA No 6: PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS

- f. Con la espátula, pasar varias porciones de la cepa a la botella, removiéndola para que queden cubiertas.
- g. Conservar las botellas en posición horizontal a temperaturas entre 25 – 28⁰C hasta que todo el trigo esté colonizado.



FOTOGRAFÍA No. 7: DISPOSICIÓN DE LAS BOTELLAS PARA LA INCUVACIÓN

- h. Incubar en oscuridad total.

3.3 PRUEBA PRELIMINAR

Se realiza una prueba inicial de manera rápida para observar el comportamiento del micelio en el suelo contaminado.

3.3.1 MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

- Plástico de invernadero
- Pala
- Canastillas de plástico
- Romana digital (Wei Heng)
- Humidímetro- phmetro (Boeco)
- Suelo contaminado
- Inóculos de *P. ostreatus* en trigo
- Residuos de cacao
- Agua destilada

3.3.2 PROCEDIMIENTO

- a. Extender el suelo contaminado sobre plástico y homogeneizar, cuidando que la granulometría final no sea muy pequeña.
- b. Mezclar y homogeneizar con residuos de cacao en una proporción del 25% en volumen.
- c. Añadir agua hasta alcanzar una humedad del 75%.
- d. Colocar plástico perforado en la base de las cajas y distribuir el suelo en cantidades aproximadamente iguales.
- e. Tomar pequeñas porciones de inóculos y colorar en la superficie de los suelos.
- f. Incubar las muestras y controlar diariamente que la humedad del ambiente esté entre 80 – 90% y la temperatura entre 28 – 30°C.



FOTOGRAFÍA No. 8: GRANULOMETRÍA

3.4 INOCULACIÓN CON *Pleurotus ostreatus* EN AGAR- PETRÓLEO

Se usa agar-agar enriquecido con petróleo.

3.4.1 MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

- Cajas petri
- Balanza digital
- Botellas de vidrio
- Espátula
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Estufa de cultivo
- Inóculos de *P. ostreatus* en agar PDA
- Agua destilada
- Agar-agar
- Petróleo

3.4.2 PROCEDIMIENTO

- a. Preparar 120 mL de agar-agar y repartir en 3 frascos de vidrio.
- b. Añadir a cada una concentración entre 0,5 a 2,5 mL de petróleo.
- c. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.
- d. Distribuir el agar-petróleo en cajas petri, agitando la botella antes de cada dosificación.
- e. Inocular las cajas con micelio de *P. ostreatus*.
- f. Incubar a 28°C y en ausencia de luz.

3.5 INOCULACIÓN EN AGAR PDA

3.5.1 MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

- Cajas petri
- Balanza digital
- Botellas de vidrio
- Espátula
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Estufa de cultivo
- Inóculos de las cajas con agar petróleo
- Agua destilada
- Agar PDA (Difco)

3.5.2 PROCEDIMIENTO

- a. Preparar 100 mL de agar PDA para 4 cajas petri.
- b. Inocular los inóculos extraídos de las cajas con agar petróleo.
- c. Incubar a 28°C y en ausencia de luz.

3.6 PREPARACIÓN DE UN INÓCULO FÚNGICO EN MEDIO LÍQUIDO

Se prepara un inóculo fúngico en medio líquido con el objetivo de inocular la mayor cantidad de sustrato.

3.6.1 MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

- Erlenmeyer de 2000 mL
- 10 erlenmeyer de 250 mL
- Tapones de esponja
- Papel aluminio
- Espátula
- Levadura
- Cepas de *P. ostreatus* var. florida
- Agitador magnético
- Vaso de precipitación de 25 mL
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Estufa de cultivo
- Agua destilada
- Fuente de carbono

3.6.2 PROCEDIMIENTO

- a. Colocar 1500 mL de agua destilada en un erlenmeyer.
- b. Agregar levadura y calentar la solución utilizando un agitador magnético.
- c. Pesar una fuente de carbono, calentar en baño maría y verter en el erlenmeyer.
- d. Distribuir 150 mL del caldo en cada erlenmeyer, tapar y cubrir con papel aluminio.
- e. Esterilizar a 121°C.
- f. Enfriar los caldos, cortar el micelio y agregar a los erlenmeyers.
- g. Agitar en el shaker e incubar a 28°C.



FOTOGRAFÍA No. 9: AGITACIÓN Y OXIGENACIÓN DE LAS MUESTRAS

3.7 ESTERILIZACIÓN DEL SUELO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS

3.7.1 MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

- Fundas polifán
- Cinta adhesiva
- Fundas de jaladera
- Canastillas de plástico
- Espátula
- Autoclave
- Suelo contaminado con hidrocarburos
- Agua destilada

3.7.2 PROCEDIMIENTO

- a. Pesar 2500g de suelo por funda polifán.

- b. Añadir 500g de agua destilada a cada funda y sellar con cinta adhesiva.
- c. Colocar cada funda en una funda de jaladera para facilitar su manipulación al colocar y sacarlas del autoclave.
- d. Realizar una esterilización durante 40 minutos por dos ocasiones.

3.8 DETERMINACIÓN DE LA MASA FÚNGICA

La masa fúngica por unidad de volumen presente en el inóculo se mide por método gravimétrico.

3.8.1 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Papel filtro
- Embudo de vidrio
- Probeta de 100mL
- Vaso de precipitación de 150mL
- Balanza digital
- Estufa de cultivo
- Agua destilada

3.8.2 PROCEDIMIENTO

- a. Pesar el papel filtro (P_0).
- b. Tomar 100mL de inóculo líquido y filtrar.
- c. Secar en una estufa el papel con el filtrado a 80°C por 1 hora.
- d. Pesar el papel con el filtrado (P_f)
- e. Determinar la concentración.

3.8.3 CÁLCULOS

$$C_f = \frac{P_f - P_0}{V}$$

Donde:

C_f = Concentración en gramos de masa fúngica por volumen

P_f = Peso del papel filtro con el filtrado

P_o = Peso del papel filtro

V = Volumen filtrado

3.9 INOCULACIÓN DE SUELOS ESTERILIZADOS

3.9.1 MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

- Espátula
- Probeta de 150mL
- Muestras de suelos esterilizados
- Canastillas de plástico
- Fundas de plástico negro

3.9.2 PROCEDIMIENTO

- a. Limpiar y desinfectar el espacio de trabajo.
- b. Tomar una muestra compuesta de suelo de las fundas esterilizadas.
- c. Secar la muestra para medir TPH inicial.
- d. Agregar el inóculo a las fundas y homogenizar las mismas.
- e. Colocar las fundas en canastillas plásticas y llevar a incubación a 28°C.

3.10 DETERMINACIÓN DE TPH

3.10.1 MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

- Espátula

- Papel aluminio
- Mortero
- Viales de secado
- Pipetas Pasteur
- Pipetas volumétricas de 5mL
- Viales para pesado
- Filtros
- Tamiz
- Jeringas (Wheaton W851012)
- Pipeteadores
- Balanza analítica (OHAUS Mod. Adventurer Pro)
- Limpiador ultrasónico (Branson 8510)
- Agitador (Vortex Mixer Mod. VM 300)
- Cromatógrafo de gases (THERMO Mod. GC – FOCUS)
- Hexano

3.10.2 PROCEDIMIENTO

- a. Tomar una muestra compuesta de cada funda y del blanco.
- b. Secar las muestras a temperatura ambiente por 48 horas.
- c. Triturar y tamizar.
- d. En viales pesar 1g de cada muestra y añadir 5mL de Hexano a cada una.
- e. Agitar por 1 minuto en agitador Vortex y 5 minutos en el limpiador ultrasónico.
- f. Tomar 1,5mL de cada solución, filtrar y recoger en viales debidamente rotulados.
- g. Determinar los TPH en el Cromatógrafo de gases.

3.11 PREPARACIÓN DEL SUSTRATO

3.11.1 MATERIALES Y REACTIVOS

- Tanque de metal de 50 GL.

- Hornilla a gas
- Fundas polifán
- Cepas de *P. ostreatus* en trigo
- Tusa de choclo triturada
- Agua
- Fungicida Benomil

3.11.2 PROCEDIMIENTO

- a. Triturar la tusa de choclo, cuidando que la granulometría obtenida sea gruesa.
- b. Dejar en remojo por 24 horas.
- c. Escurrir y llevar a temperatura de ebullición por 1 hora y 20 minutos.
- d. Escurrir y sumergir en una solución de Benomil al 0,02% durante 1 hora.
- e. Escurrir nuevamente y extender para eliminar el exceso de humedad y dejarla al 40 – 50% de humedad (Higroscópica).
- f. Mezclar el sustrato con el inóculo al 5% en peso.
- g. Enfundar y llevar a incubación, colgando las fundas, en ausencia de luz, con temperaturas entre 24 – 28°C y con humedad ambiental del 90%.
- h. No dejar las fundas asentadas, recostadas o arrimadas.
- i. Al segundo día de incubación perforar las fundas (huecos medianos) para permitir el ingreso de oxígeno y humedad. También es recomendable enfundar el sustrato en fundas previamente perforadas.
- j. Una vez por semana se debe desmenuzar el sustrato para evitar el efecto de momificación que consiste en una especie de petrificación del sustrato que impide la correcta circulación de aire y humedad.
- k. Cuando todo el sustrato esté invadido, retirar las fundas para su utilización y el sobrante debe ser conservado en refrigeración a 4°C.



FOTOGRAFÍA No. 10: COLOCACIÓN DE LAS FUNDAS PARA INCUBACIÓN

3.12 INOCULACIÓN DE SUELOS NO ESTERILIZADOS

3.12.1 MATERIALES Y REACTIVOS

- Canastillas de plástico
- Plástico de invernadero
- Fundas grandes de plástico negro
- Romana digital
- Inóculos de *P. ostreatus* en tusa de choclo.
- Agua
- Pala
- Recipiente de forma regular

3.12.2 PROCEDIMIENTO

- a. Extender y homogeneizar el suelo con una pala.
- b. Colocar plástico perforado en cada canastilla.
- c. Pesar 6 kg de suelo y marcar el nivel para determinar su volumen.

- d. Tomar el mismo volumen de sustrato para cada caja y pesar.
- e. Mezclar el suelo con el sustrato, homogeneizar y determinar el nuevo volumen.
- f. Pesar 600g de inóculo y marcar su volumen para determinar su densidad.
- g. Pesar la cantidad determinada de inóculo para cada caja, desmenuzarlo y mezclarlo con el suelo.
- h. Inocular y homogeneizar.
- i. Incubar a 28 °C, 85 – 90% de humedad y cubrir las canastillas con plástico negro.
- j. Diariamente agregar 150mL de agua a cada caja para mantener la humedad del sustrato.



FOTOGRAFÍA No. 11: INOCULACIÓN

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO

Los resultados del suelo contaminado con hidrocarburos referente a las densidades demuestran que la densidad real es inferior a la establecida para un suelo mineral, estas variaciones se presentan en suelos arcillosos debido a la cantidad de materia orgánica, mientras que el valor de densidad aparente es normal para suelos arcillosos. El valor de porosidad del suelo evidencia un suelo compactado como lo establece Buckman (15).

El suelo contaminado con hidrocarburos es ligeramente ácido, este comportamiento es típico para suelos de climas húmedos como lo es en Sacha, debido a que las precipitaciones son altas como para lixiviar las bases, como lo establece Buckman (15).

Eweis (27) establece que la capacidad de campo para un suelo va de 18 a 30% en función del contenido de arcilla, por lo que el valor de 27 % en el suelo caracterizado es un valor normal para un suelo arcilloso.

Los resultados de MO están dentro de los valores normales para un suelo arcilloso, establecido en Eweis (27). Dentro del análisis de macronutrientes C/N/P/K relación 100/10/1/1, se determinó la deficiencia de nitrógeno, exceso de fósforo y equilibrio de potasio.

El valor de 4208 mg/Kg de TPH es superior al límite permisible establecido en la Tabla 6, Decreto 1215. Los valores de metales pesados indican que se encuentran dentro de los límites permisibles de dicho decreto.

Los resultados se detallan a continuación en la Tabla No.7.

TABLA NO. 7: DESCRIPCIÓN DE LOS VALORES DE FONDO

PARÁMETROS	VALORES DE FONDO
Profundidad	Línea Base
TPH	4208
HAP's	0,0137
Cd	<0,8
Ni	6,79
Pb	2,78
pH	5,87
% N	0,089
P total mg/Kg	2250
P asimilable meq/100g	11
k asimilable meq/100g	0,157
k total mg/Kg	1025
% de arena	30
% limo	48,000
% de Arcilla	2
Textura	FRANCO LIMOSO
% Materia Orgánica	4,060
Heterótrofos Totales UFC	1×10^5

En las tablas 8 y 9 (Anexos 1 y 2), se presentan los resultados de los análisis de los parámetros indicados en el proyecto de caracterización para la remediación del derrame en el Pozo Sacha 161.

En las tablas subsiguientes 10, 11 y 12, se presentan los resultados de la caracterización química ambiental de los suelos que la realizó el Laboratorio LAB-CESTTA, con muestras entre 0 y 4,5 m de profundidad.

TABLA No. 10: ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LAS MUESTRAS TOMADAS COMO LÍNEA BASE FUERA DEL SECTOR CONTAMINADO

LINEA BASE					
	TPH mg/Kg	HAP's mg/Kg	Cd mg/Kg	Ni mg/Kg	Pb mg/Kg
VALORES MÁXIMOS	546,79	0,0137	<0,8	6,79	<20
VALORES MÍNIMOS	546,79	0,0137	<0,8	6,79	<20
PROMEDIO	546,79	0,0137	<0,8	6,79	<20

TABLA No. 11: ANÁLISIS GENERAL DE RESULTADOS

ANÁLISIS GENERAL DE RESULTADOS					
	TPH mg/Kg	HAP's mg/Kg	Cd mg/Kg	Ni mg/Kg	Pb mg/Kg
VALORES MÁXIMOS	115099,62	1,8307	2,26	149,28	56,23
VALORES MÍNIMOS	96,90	0,0113	<0,8	2,09	1,20
PROMEDIO	8781,40	0,3623	1,40	13,39	6,94

TABLA No. 12: COMPARACIÓN DE RESULTADOS OBTENIDOS DE TODAS LAS MUESTRAS TOMADAS A DIFERENTES PROFUNDIDADES CON EL REGLAMENTO AMBIENTAL PARA OPERACIONES HIDROCARBURÍFERAS DINAPA 1215.

COMPARACIÓN CON LÍMITES PERMISIBLES (expresado en porcentaje de cumplimiento)				
USO AGRICOLA				
TPH	HAP's	Cd	Ni	Pb
53%	100%	98%	98%	100%
USO INDUSTRIAL				
TPH	HAP's	Cd	Ni	Pb
71%	100%	100%	98%	100%
ECOSISTEMAS SENSIBLES				
TPH	HAP's	Cd	Ni	Pb
36%	96%	93%	98%	100%

Los valores del porcentaje de cumplimiento indican que los TPH de la zona contaminada en el pozo Sacha 161 se encuentran fuera de los límites máximos permisibles para todo tipo de suelo.

4.2 REACTIVACIÓN DEL MICELIO

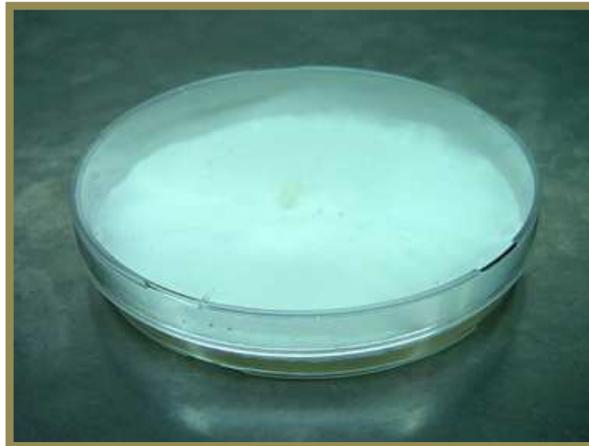
El crecimiento miceliar es normal, lo que indica que la cepa es activa, pese a haber permanecido en refrigeración por un tiempo prolongado. El micelio es de color blanco y de aspecto algodonoso, característico de *P. ostreatus*, obteniéndose además la colonización completa de la caja en un lapso de diez días.



FOTOGRAFÍA No. 12: CRECIMIENTO EN 24 HORAS



FOTOGRAFÍA No. 13: CRECIMIENTO EN 48 HORAS.



FOTOGRAFÍA No. 14: COLONIZACIÓN EFECTIVA EN 10 DÍAS

4.3 PREPARACIÓN DE INÓCULOS

Como sustrato se utilizó granos de trigo perlado. Las propiedades físico-químicas del sustrato son las que determinan que hongos o que microorganismos pueden crecer en él.

El crecimiento micelial es normal, el inicio de la colonización es visible en 24 horas como se puede observar en las fotografías 15 y 16.



FOTOGRAFÍA No. 15: CRECIMIENTO EN 24 HORAS



FOTOGRAFÍA No. 16: CRECIMIENTO EN 96 HORAS

4.4 PRUEBA PRELIMINAR

Para esta prueba se preparó el suelo contaminado, mezclándolo con un 25% en volumen de residuos de cacao traído de una plantación cercana al derrame. Las muestras no fueron esterilizadas y dado que se trató de una prueba aleatoria, no se pesó los inóculos.

Los micelios crecen rápidamente durante los cuatro primeros días, pero luego se detiene y en el transcurso de los siguientes días el micelio desaparece, por tal razón, se decidió realizar otras pruebas en el laboratorio directamente sobre petróleo.



FOTOGRAFÍA No. 17: CRECIMIENTO INICIAL

Dado a que el crecimiento micelial no fue favorable los suelos investigados fueron empacados en fundas plásticas y llevados a la plataforma donde se realizan los trabajos de investigación del CESTTA en el campamento Sacha 161 para su disposición final.

4.5 INOCULACIÓN CON *Pleurotus ostreatus* EN AGAR- PETRÓLEO

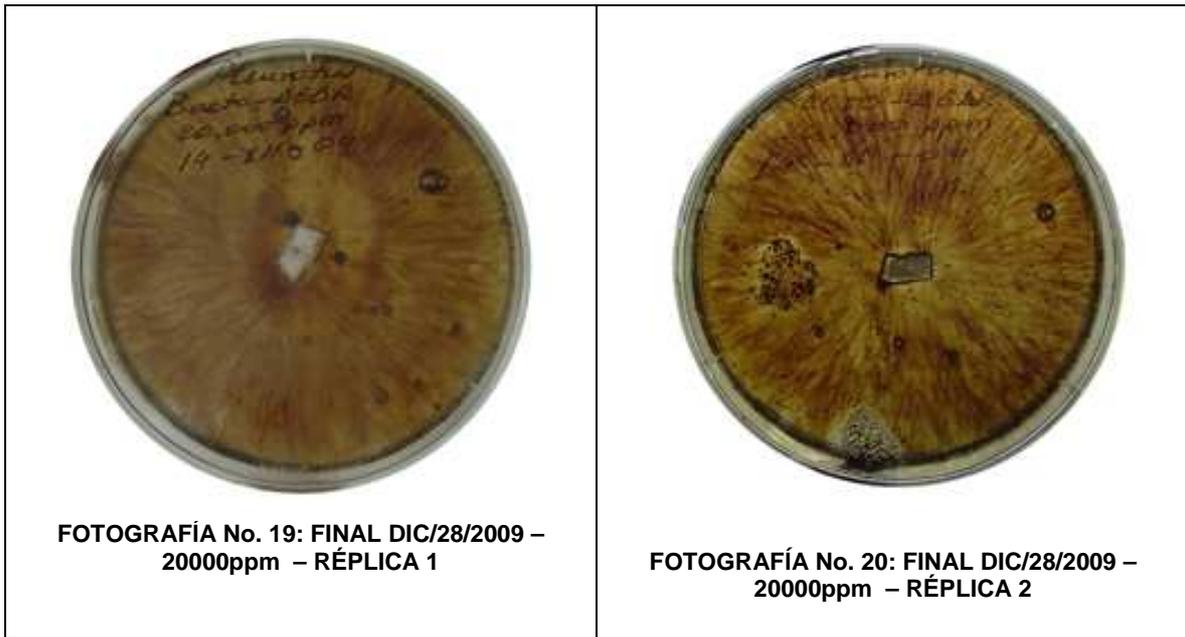
Se observó un desarrollo micelial inusual, puesto que no se observa el micelio blanco característico sino un micelio ramificado de color oscuro de características distintas a las de *P. ostreatus*. Este resultado se obtuvo en un lapso de dos semanas.

En el laboratorio de la Facultad de Agronomía de la ESPOCH, se trabaja en la producción y comercialización de otros hongos utilizados en actividades agrícolas, lo cual sugiere que los resultados obtenidos fueron producto de una posible contaminación.

En las fotografías que se presentan a continuación se observa el desarrollo de *P. ostreatus* a una concentración de 20000 ppm de petróleo. Se observa igual desarrollo micelial de *P. ostreatus* a 40000 y 60000 ppm.



FOTOGRAFÍA No. 18: INICIO DIC/14/2009 – 20000 ppm



4.6 INOCULACIÓN EN AGAR PDA

Para descartar la posible contaminación, se realizó réplicas en agar PDA utilizando inóculos de los micelios obtenidos en agar petrolizado, para determinar el causante de estos resultados. Los resultados fueron similares en las cuatro cajas, obteniéndose el crecimiento de *P. ostreatus* en un tiempo normal de 10 días. Esto nos indica que en las pruebas preliminares, el micelio no murió, sino que se adaptó a un nuevo sustrato y creció en una forma no esperada, por lo que no se lo pudo observar a simple vista.



FOTOGRAFÍA No. 21: DÍA 1 MICELIO DE COLOR OSCURO



Debido a estos resultados, se decidió realizar una nueva prueba inoculando *P. ostreatus* en agar petróleo para observar la velocidad crecimiento y compararlo con la velocidad de crecimiento en agar PDA.

4.7 PRUEBAS DE CRECIMIENTO EN AGAR PETRÓLEO

En las cajas con agar PDA, la velocidad de crecimiento miceliar es igual. En agar petróleo no se observa crecimiento miceliar, pero sí un halo que se caracteriza por tener una coloración más clara que la zona que aún no ha sido invadida.

En las cajas con agar petróleo, los micelios crecen a un mismo ritmo pero con una velocidad mayor que en el agar PDA, lo que se evidencia por el tamaño del halo, indicándonos que *P. ostreatus* es más invasivo en agar petróleo que en agar PDA.

Tanto en las pruebas preliminares sobre suelo contaminado como en agar petróleo, no existe crecimiento micelial, por lo tanto no hubo fructificación.



AGAR PDA AGAR PETRÓLEO

FOTOGRAFÍA No. 24: DÍA 1
INOCULACIÓN USANDO LA MISMA CEPA DE *P. ostreatus*



AGAR PDA AGAR PETRÓLEO

FOTOGRAFÍA No. 25: DÍA 7
INOCULACIÓN USANDO LA MISMA CEPA DE *P. ostreatus*



AGAR PDA AGAR PETRÓLEO

FOTOGRAFÍA No. 26: DÍA 10
INOCULACIÓN USANDO LA MISMA CEPA DE *P. ostreatus*



AGAR PDA AGAR PETRÓLEO

FOTOGRAFÍA No. 27: DÍA 14
INOCULACIÓN USANDO LA MISMA CEPA DE *P. ostreatus*

En los ensayos preliminares, no hubo crecimiento micelial pero la actividad continuó sin ser visible debido a que este cambia su estructura para adaptarse al nuevo sustrato.

La continuidad de esta actividad micelial se demostró con los resultados obtenidos dos meses después de la realización de estas pruebas, en las que se obtuvo un crecimiento micelial en agar petróleo. El crecimiento de micelio es lento y en poca cantidad. El nuevo micelio no es invasivo y su desarrollo se da de manera puntual, su crecimiento es en forma vertical.

A continuación se presenta las fotografías del crecimiento micelial de *P. ostreatus* a los 60, 80 y 100 días en agar petróleo.



FOTOGRAFÍA No. 28: DESARROLLO MICELIAR EN AGAR PETRÓLEO 60 DÍAS DESPUÉS



FOTOGRAFÍA No. 29: DESARROLLO MICELIAR EN AGAR PETRÓLEO 80 DÍAS DESPUÉS



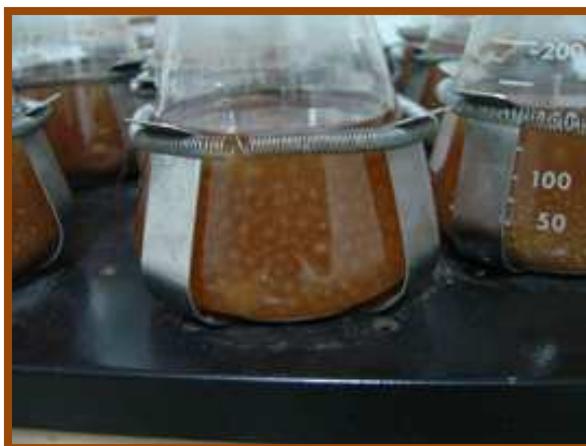
FOTOGRAFÍA No. 30: DESARROLLO MICELIAR EN AGAR PETRÓLEO 100 DÍAS DESPUÉS

En el sustrato no se observaron cambios significativos sino los relacionados al tamaño del micelio debido a su crecimiento.



4.8 PREPARACIÓN DE UN INÓCULO FÚNGICO EN MEDIO LÍQUIDO

Luego de 48 horas de incubación, se observa un crecimiento atípico, aparecieron grumos y no una masa uniforme característica de *P. ostreatus*.



FOTOGRAFÍA No. 33: CRECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO

La incubación continuó por 48 horas más y se observó el crecimiento de micelios de *P. ostreatus* en las paredes de los erlenmeyer, pero la presencia de grumos en el caldo no es común.

4.9 PRUEBAS A PARTIR DE LOS INÓCULOS EN MEDIO LÍQUIDO

Para descartar una posible contaminación se tomaron los grumos como inóculos para una nueva siembra en agar PDA.

Luego de 48 horas de incubación, el comportamiento fue similar en todas las cajas, los cultivos no estuvieron contaminados, por lo que continuaron en incubación.

Después de 72 horas, se observó el crecimiento de hifas de *P. ostreatus* pero se decide continuar con la incubación para observar resultados.

Después de 7 días de incubación, se observó el crecimiento de *P. ostreatus* en todas las cajas, lo que demuestra que los grumos fueron micelios de *P. ostreatus*.

En las fotografías 34, 35 y 36, se observa el crecimiento de *P. ostreatus* a las 48 horas, 72 horas y 7 días.

4.10 INOCULACIÓN DE SUELOS ESTERILIZADOS

Se continuó con la siguiente fase de la investigación que consistió en la inoculación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo utilizando el inóculo fúngico en medio líquido y la determinación de TPH.

Cuando se agregó agua destilada a la probeta para recoger todo el inóculo, se observó que los grumos tomaban la forma del micelio blanco algodonoso característico del *P. ostreatus* como se visualiza en la fotografía No 37.



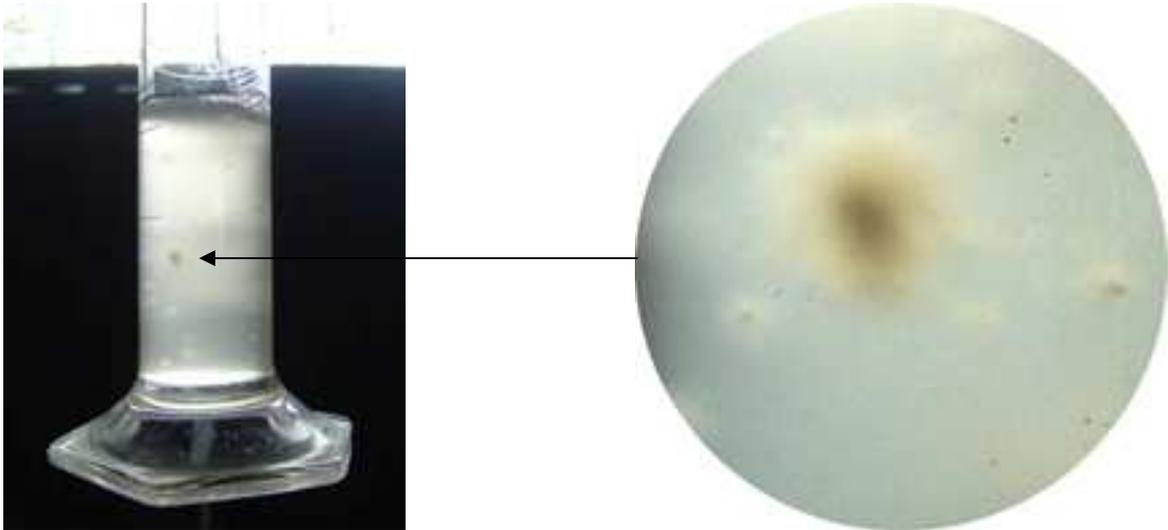
FOTOGRAFÍA No. 34: INCUBACIÓN 48 HORAS



FOTOGRAFÍA No. 35: INCUBACIÓN 72 HORAS



FOTOGRAFÍA No. 36: INCUBACIÓN 7 DÍAS



FOTOGRAFÍA No. 37: ASPECTO DEL MICELIO EN MEDIO LÍQUIDO

4.11 DETERMINACIÓN DE TPH DE MUESTRAS ESTERILIZADAS

Dado que los suelos fueron esterilizados inicialmente para este análisis, e inoculados con *P. ostreatus* se confirma que el micelio fue el único agente biorremediador presente y no hubo interacción con ningún otro microorganismo.

Los resultados de la determinación de TPH se muestran en el cuadro No. 1. (Anexo 3)

A continuación se presenta las graficas de disminución de TPH del Blanco (Gráfica No 2), concentración C1 (Gráfica No 3), concentración C2 (Gráfica No 4), concentración C3 (Gráfica No 5), concentración C4 (Gráfica No 6) y durante 58 días (Gráfica No. 7).

GRÁFICO No. 2: CURVA DE DISMINUCIÓN DE TPH PARA LA MUESTRA BLANCO

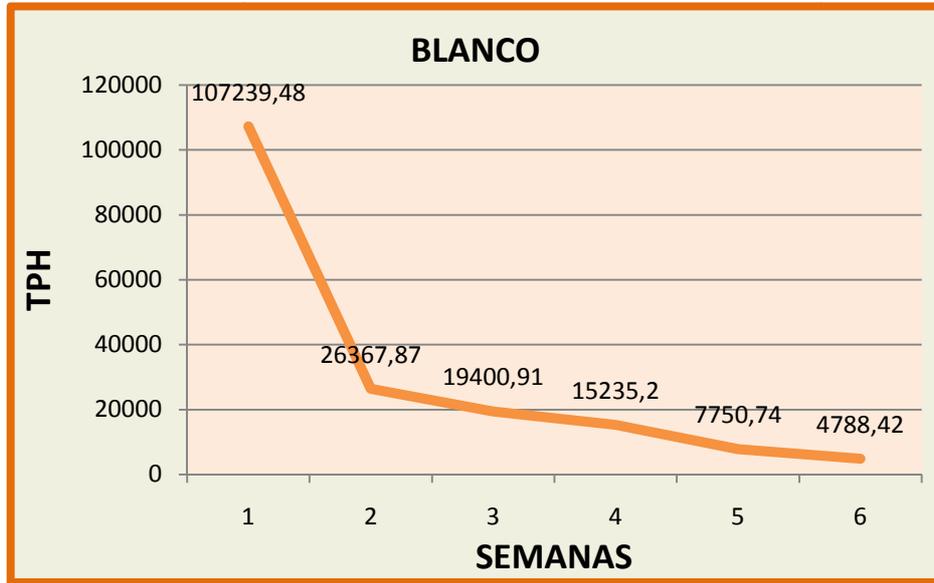


GRÁFICO No. 3: CURVA DE DISMINUCIÓN DE TPH PARA LA CONCENTRACIÓN C1

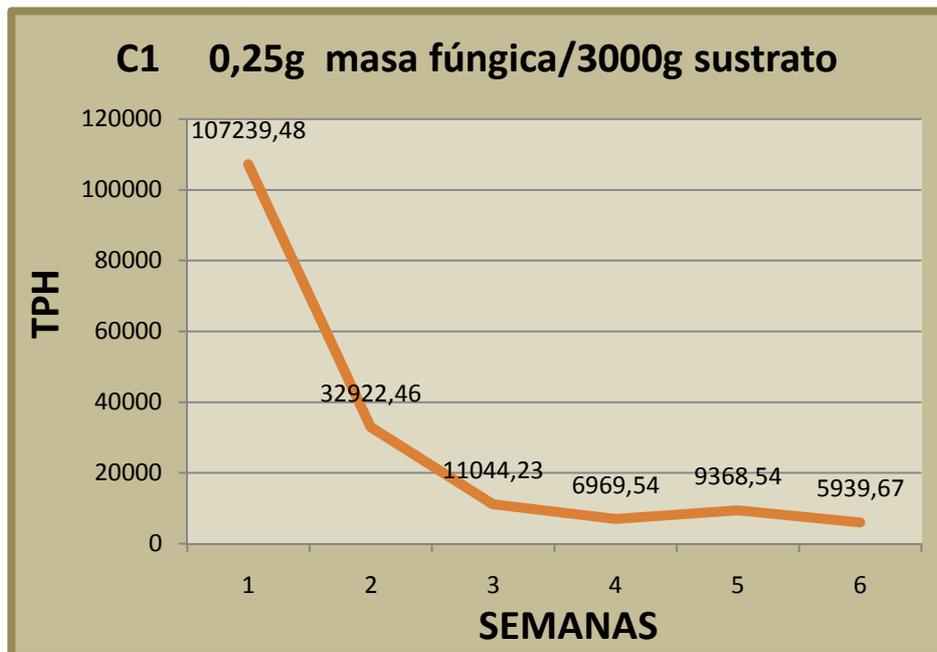


GRÁFICO No. 4: CURVA DE DISMINUCIÓN DE TPH PARA LA CONCENTRACIÓN C2

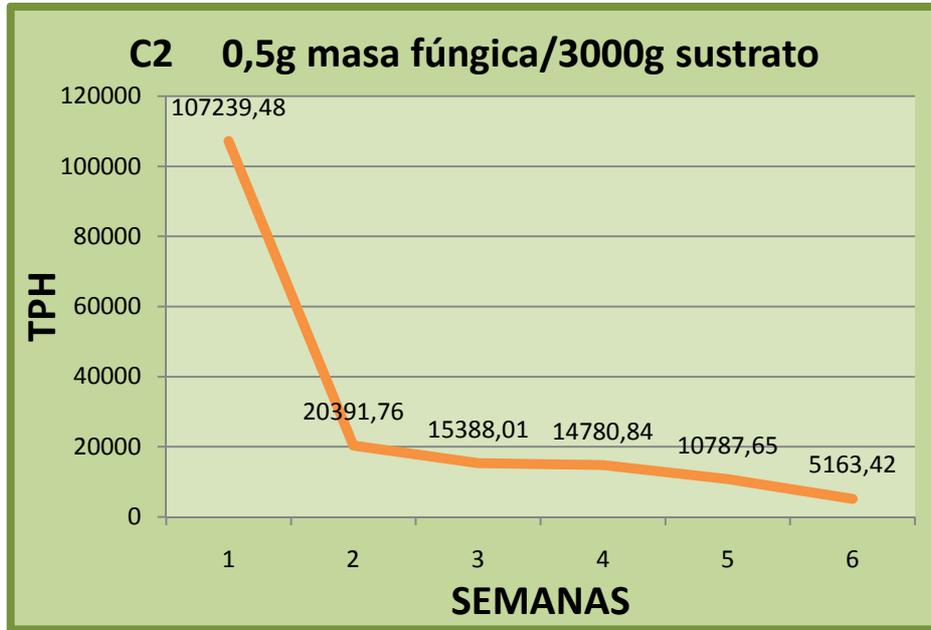


GRÁFICO No. 5: CURVA DE DISMINUCIÓN DE TPH PARA LA CONCENTRACIÓN C3

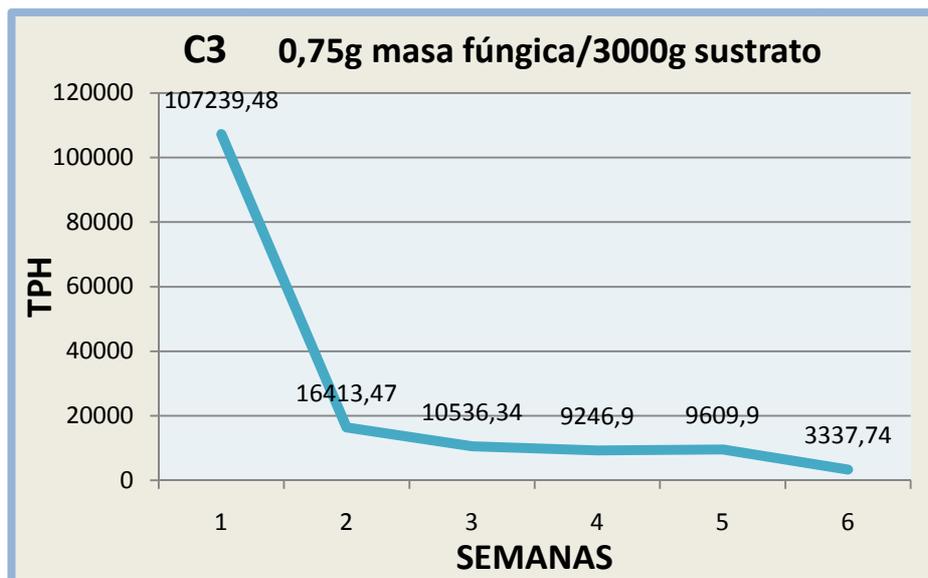


GRÁFICO No. 6: CURVA DE DISMINUCIÓN DE TPH PARA LA CONCENTRACIÓN C4

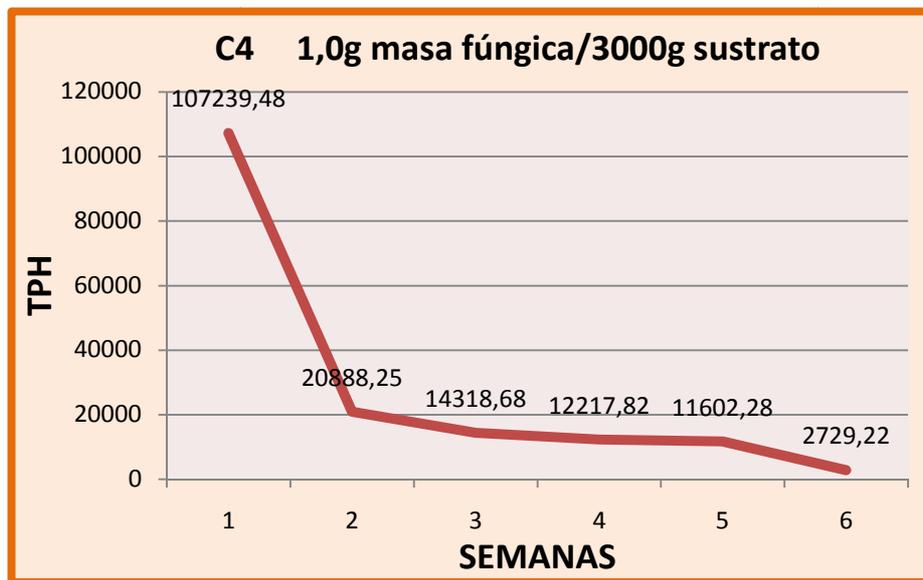
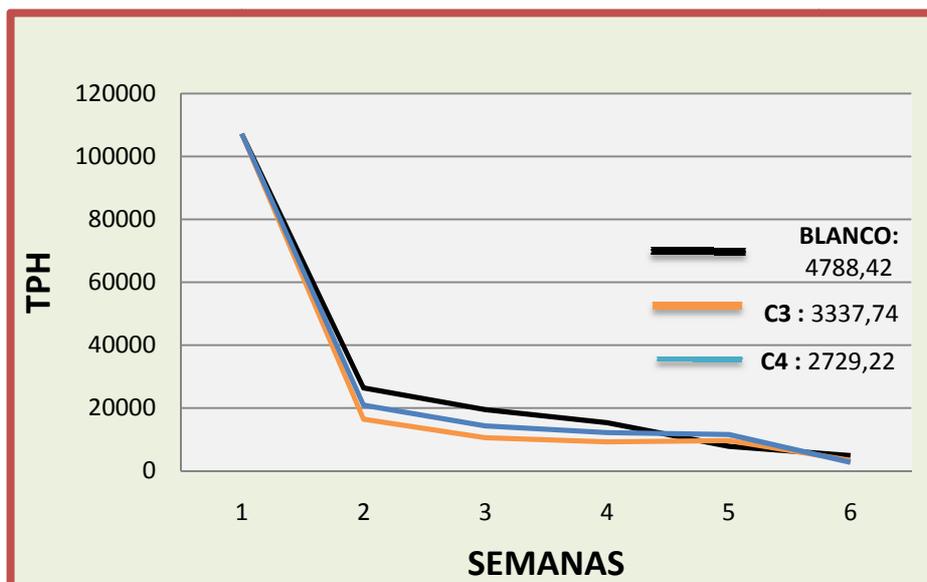


GRÁFICO No. 7: COMPARACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE TPH CON LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE INÓCULO



En todas las muestras, los TPH disminuyen rápidamente durante la primera semana, esto se debe a la volatilización de la fracción liviana del petróleo C₄ - C₁₂ presente. Durante las siguientes semanas, la disminución es más lenta debido ya que la degradación se realiza en la fracción pesada de petróleo.

La muestra blanco tiene el mismo comportamiento que las muestras inoculadas, probablemente debido a una contaminación con *P. ostreatus* durante los muestreos.

Las concentraciones C3 y C4 son las que han dado mejor resultado en la disminución de TPH, demostrando químicamente que la actividad enzimática de *P. ostreatus* degrada al petróleo para tomar el carbono necesario para su metabolismo.

Al final del proceso de degradación, las propiedades organolépticas de color y olor del suelo mejoraron considerablemente hasta tener las características de un suelo normal. Estos cambios son considerados como las pruebas físicas de que *P. ostreatus* se alimenta del carbono contenido en el petróleo.

El análisis estadístico se detalla en la Tabla No 13, mediante un Análisis de Varianza y en la Tabla No 14, con el análisis de la Prueba de Tukey.

TABLA No. 13: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LAS MUESTRAS ESTERILIZADAS

Ho: $\mu_{0,25} = \mu_{0,5} = \mu_{0,75} = \mu_{1,0}$

Hi: Por lo menos una concentración es diferente.

FV	GL	SC	CM	F
Concentraciones	4	64519794.52	16129948.631	0.268 (ns)
Error	20	1202737932.27	60136896.614	
Total	24	1267257726.79		

CV = 61.27%

FV: Fuente de variación

GL: Grados de libertad

SC: Suma de cuadrados

CM: Cuadrado medio

F: F calculado

CV: Coeficiente de variación

Del Análisis de Varianza se determina que F tiene un valor NO SIGNIFICATIVO por lo que aceptamos la hipótesis nula que “No existen diferencias significativas entre las distintas concentraciones”.

El coeficiente de variación es muy alto debido a la gran diferencia entre los valores iniciales y finales de TPH, lo que significa que la biorremediación fue considerable.

Para la determinación de las concentraciones más favorables se utilizó la Prueba de Tukey.

TABLA No. 14: PRUEBA DE TUKEY PARA LAS MUESTRAS ESTERILIZADAS

CONCENTRACIÓN	MEDIA	RANGO
1	14710	a
3	13300	a
2	13090	a
5	12350	a
4	9829	a

Todas las medias son estadísticamente iguales, por lo que no hay diferencias significativas entre concentraciones.

4.12 RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE TPH DE MUESTRAS NO ESTERILIZADAS

El suelo presentó una alta contaminación, lo que se evidenció por el olor y por su color negro. Presentó además una granulometría muy pequeña, lo que dificultaría la oxigenación y paso de la humedad durante el proceso, por tal razón se decidió que el suelo sería mezclado con sustrato en proporciones iguales en volumen.



FOTOGRAFÍA No. 38: COLORACIÓN OSCURA DE LA MUESTRA

Se realizó una prueba de infiltración pero su granulometría lo hace impermeable, además por el grado de contaminación, el suelo no podrá ser humectado puesto que el petróleo y el agua son inmiscibles.

Se realizaron varias pruebas utilizando diferentes sustratos, siendo la tusa de choclo la que dio mejor resultado.

El sustrato (tusa de choclo) fue preparado poniéndolo en remojo por 24 horas y 1 hora en solución de Benomil al 0,02%.

Se inoculó los sustratos a diferentes concentraciones: 4, 7, 11 y 17 % en volumen con tres réplicas cada uno. Se eligió estos valores para no seguir un orden lógico predecible.

Una vez por semana se desmenuzó el sustrato para evitar el efecto de momificación que consiste en una especie de petrificación del sustrato que impide la correcta circulación de aire y humedad.

Cuando todo el sustrato estuvo invadido (fotografía No 39), se retiró las fundas para su utilización y el sobrante fue conservado en refrigeración a 4⁰C.



FOTOGRAFÍA No. 39: SUSTRATO INVADIDO

El inóculo se agregó al suelo, tomando la precaución de controlar la humedad y la temperatura para la incubación con el fin que el *P. ostreatus* realice el proceso de degradación del petróleo.

Se midió la degradación analizando los TPH en cada unidad de control y los resultados se presentan en el cuadro No 2. (Anexo 4).

A continuación se presenta las graficas de disminución de TPH del Blanco (Grafica No 8), concentración C1 (Grafica No 9), concentración C2 (Grafica No 10), concentración C3 (Grafica No 11), concentración C4 (Grafica No 12) durante 49 días.

GRÁFICO No. 8: CURVA DE DISMINUCIÓN DE TPH PARA LA MUESTRA BLANCO

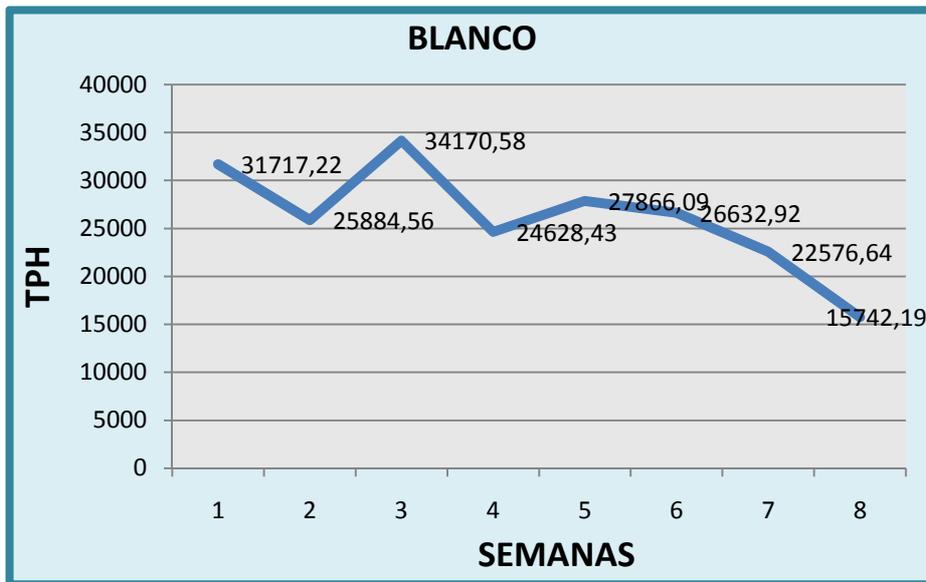


GRÁFICO No. 9: CURVA DE DISMINUCIÓN DE TPH PARA LA CONCENTRACIÓN 1

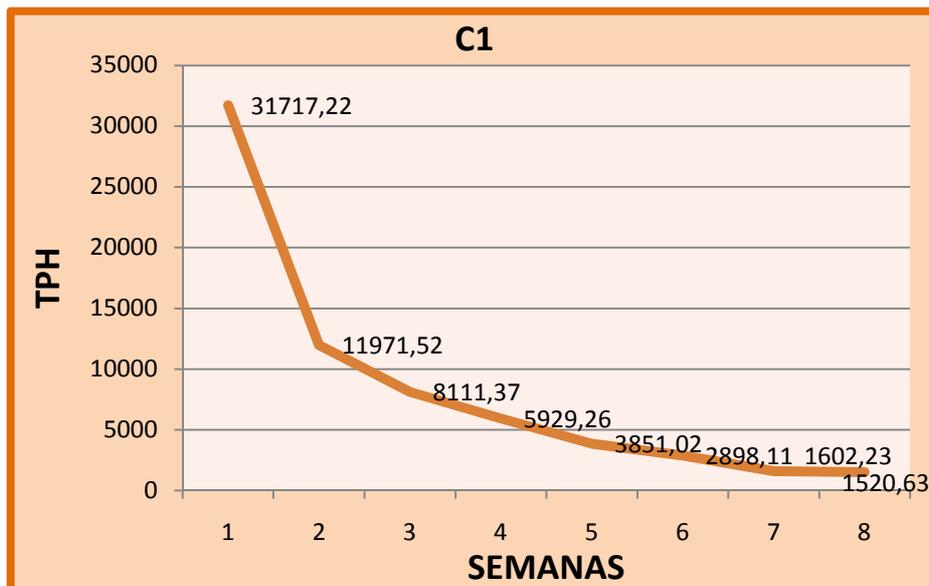


GRÁFICO No. 10: CURVA DE DISMINUCIÓN DE TPH PARA LA CONCENTRACIÓN 2

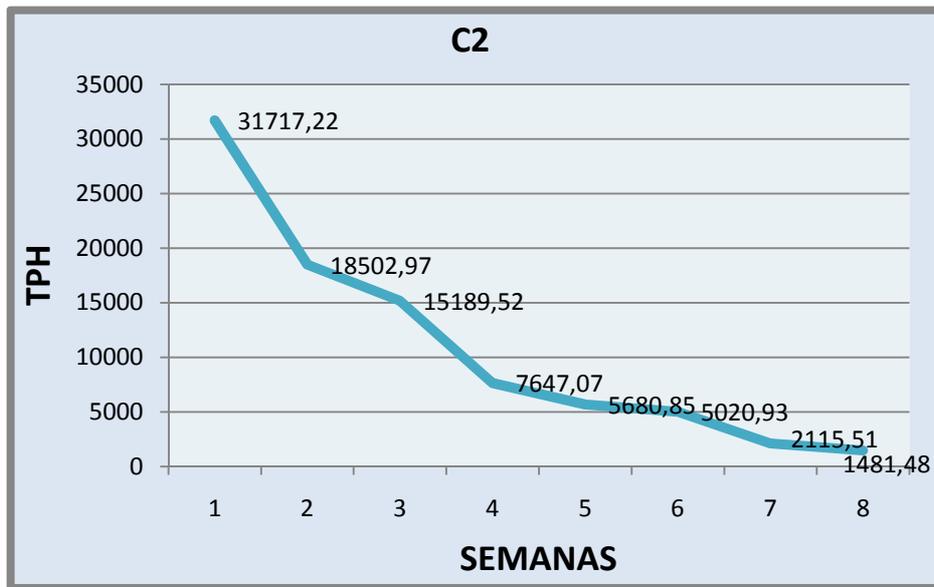
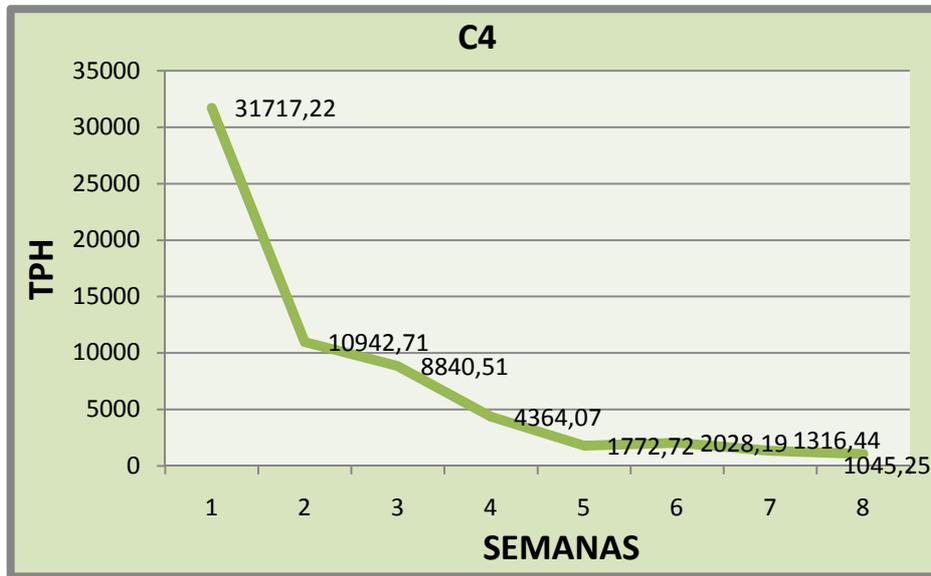


GRÁFICO No. 11: CURVA DE DISMINUCIÓN DE TPH PARA LA CONCENTRACIÓN 3



GRÁFICO No. 12: CURVA DE DISMINUCIÓN DE TPH PARA LA CONCENTRACIÓN 4



Todas las concentraciones lograron bajar los TPH hasta valores inferiores al límite máximo permisible en suelos para uso agrícola establecido en el RAOHE 1215.

Estos procesos no necesitaron tratamientos mecánicos ni químicos, los únicos factores que se controlaron fueron temperatura y humedad, lo que hace que este mecanismo de biorremediación sea factible en el Oriente ecuatoriano por presentar condiciones favorables de temperatura y humedad.

Dado que todas las concentraciones lograron biorremediar los suelos contaminados, este método se presenta como una buena alternativa para recuperarlos y retomar las actividades agrícolas de los habitantes de la zona, generando un beneficio social, económico y ambiental.

Las unidades experimentales C3 (1058,07 mg/kg) y C4 (1045,25 mg/kg) fueron las que dieron los mejores resultados.

El análisis estadístico se detalla en la Tabla No 15, mediante un Análisis de Varianza y en la Tabla No 16, con el análisis de la Prueba de Tukey.

TABLA No. 15: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LAS MUESTRAS NO ESTERILIZADAS

Ho: $\mu_{4\%} = \mu_{7\%} = \mu_{11\%} = \mu_{17\%}$

Hi: Por lo menos una concentración es diferente.

FV	GL	SC	CM	F	Probabilidad
Concentraciones	4	2282551663.51	570637915.88	24.93	0.000
Error	30	686799363.08	22893312.10		
Total	34	2969351026.59			

CV = 50.77%

Del Análisis de Varianza se determina que F calculado tiene un valor significativo por lo que rechazamos la hipótesis nula y decimos que por lo menos una concentración es diferente.

En este caso, la muestra blanco es diferente a las demás muestras, ya que su valor de 15742,19 mg/kg es superior a los valores finales en las cuatro unidades experimentales. Podemos apreciar en la grafica 7 de la unidad Blanco que la curva no es la normal, esto es debido a que las muestras tomadas a analizar TPH no fueron representativas de la totalidad de la unidad.

El coeficiente de variación es alto por la diferencia entre los TPH iniciales y finales, por lo que podemos decir que la biorremediación es considerable.

Para la determinación de las concentraciones más favorables se utilizó la Prueba de Tukey. (Tabla No 16).

TABLA No. 16: PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA LAS MUESTRAS NO ESTERILIZADAS

CONCENTRACIÓN	MEDIA	RANGO
1	25360	a
3	7948	b
2	5083	b
4	4400	b
5	4330	b

La concentración de la unidad experimental No 1 es diferente a las demás, por lo tanto, a excepción de la concentración 1 (BLANCO) todas las demás concentraciones son favorables en el proceso de biorremediación.

En las unidades experimentales no esterilizadas los TPH bajaron más, ya que la flora microbiana nativa presente en el suelo junto con el *P. ostreatus* contribuyeron a degradar en menor tiempo el petróleo presente.

Los mejores resultados se obtuvieron con las unidades experimentales C4 y C5.

4.13 EFICIENCIA DEL PROCESO

Los porcentajes de eficiencia para las unidades experimentales con suelo esterilizado y no esterilizado se presentan en la Tabla No 17.

TABLA No. 17: PORCENTAJE DE EFICIENCIA EN LA BIORREMEDIACION EN SUELOS ESTERILIZADOS Y NO ESTERILIZADOS

SUELO ESTERILIZADO	
UNIDADES EXPERIMENTALES	PORCENTAJE DE EFICIENCIA
B	95,53
C1	94,46
C2	95,18
C3	96,88
C4	97,45
SUELO NO ESTERILIZADO	
UNIDADES EXPERIMENTALES	PORCENTAJE DE EFICIENCIA
B	50,36
C1	95,20
C2	95,32
C3	96,66
C4	96,70

Son muchas las técnicas utilizadas para tratar el problema de los hidrocarburos, entre las cuales podemos comparar:

CHIU, S., y otros, (19) utilizaron en laboratorio un compost de hongos *Pleurotus pulmonarius* y bacterias para tratar suelos contaminados con aceite, logrando la remoción por parte de un 3% de compost de hongos *Pleurotus pulmonarius*, de 56–64% de TPH. Además por medio de este consorcio de bacterias y hongos inoculados en muestras de suelos esterilizados, se logró que estas muestras tengan una mayor remoción de los contaminantes que la alcanzada por otras poblaciones microbianas en menos de un mes.

En la presente investigación se utilizó un inóculo de *P. ostreatus* en suelos esterilizados, logrando una disminución de TPH de un valor inicial de 107239,48 mg/kg a 2729,22 mg/kg con una remoción entre el 94,5 a 97,5% de TPH en dos meses.

Steliga, T. y otros, (64), trataron ex-situ suelos con un alto nivel de impurezas de petróleo de 102417 – 132472 TPH, inoculando los suelos con biopreparaciones basadas en hongos y bacterias nativas, logrando la disminución de TPH en un 93,8–94,3% en nueve meses. En nuestra investigación se ha logrado disminuir el TPH en suelos no esterilizados utilizando *P. ostreatus* y microorganismos nativos del suelo de 31717,32 mg/kg a 1045,25 mg/kg con una remoción entre 95,2 a 96,7% de TPH en dos meses.

GAVILANES, V. y PAREDES, A., (31), utilizaron residuos orgánicos domésticos, y la técnica de biopilas como tratamiento de biorremediación para suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo que contenían TPH >5000 mg/kg, en el Pozo Sacha 161 logrando biodegradar hasta el 98 % de TPH en cuatro meses. La presente investigación utilizó el mismo suelo contaminado del Pozo Sacha 161 con un valor superior de TPH, utilizándose únicamente inóculos de *P. ostreatus* como agente biorremediador. No se utilizaron consorcios bacterianos, las bacterias que actuaron en este proceso fueron las bacterias nativas presentes en las muestras de suelo y el grado de remoción de 96,6 % es similar, pero en menor tiempo, lo que demuestra que la utilización de *P. ostreatus* es una excelente alternativa para biorremediar suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

1. Los resultados de los análisis realizados por el CESTTA para la caracterización del suelo objeto de biorremediación, indican que los valores de TPH (107239,48 mg/kg) de la zona contaminada en el pozo Sacha 161 están por encima del límite máximo permisible establecido en el RAOHE decreto 1215 para uso industrial (4000 mg/kg), además de poseer un número de bacterias heterótrofas (1×10^5), insuficiente para un proceso de biorremediación.
2. Se observó la actividad del hongo *P. ostreatus* como degradador de los hidrocarburos presentes, y al trabajar con suelos esterilizados, se determinó que por sí solo es capaz de degradar los hidrocarburos hasta en un 97%, y en interacción con la flora bacteriana nativa presente en bajas cantidades, se logra degradar los TPH en un porcentaje similar pero en tiempos menores a los utilizados en otras investigaciones, demostrando así, su importancia como biodegradador de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, ya que presenta además la ventaja de no necesitar tratamientos químicos o mecánicos complejos.
3. De las distintas pruebas que se han realizado para obtener micelios de *P. ostreatus*, el crecimiento ha sido diferente dependiendo del sustrato y la morfología ha variado como un mecanismo de adaptación a cada medio.
4. Las unidades experimentales C3 (3337,74 mg/kg) y C4 (2729,22 mg/kg) en muestras esterilizadas son las que han dado mejor resultado en la disminución de

TPH, acercándose al valor del límite máximo permisible establecido en la tabla 6 del RAOHE 1215 para disposición de suelos para uso industrial (<4000 mg/kg), logrando una remoción en un lapso de ocho semanas del 96,9% y 97,4% respectivamente.

5. Las unidades experimentales en suelos no esterilizados C3 (1058,07 mg/kg) y C4 (1045,25 mg/kg) fueron las que dieron los mejores resultados, bajando los TPH hasta valores inferiores a los establecidos en suelos para uso agrícola (<2500 mg/kg), logrando una remoción en un lapso de siete semanas del 96,6% y 96,7% respectivamente.
6. No existe una diferencia significativa en la remoción de TPH entre los dos métodos: suelo estéril (97,4%) y suelo no estéril (96,7%). En función de tiempo, costos (proceso de esterilización) y logística es conveniente para una biorremediación *ex-situ* trabajar con suelos no esterilizados.

5.2 RECOMENDACIONES

1. Es necesario contar con un micelio joven del hongo para la realización de todas las pruebas, de manera que el número de réplicas que se realicen a lo largo de la investigación no sean mayores a siete.
2. Las muestras de suelo contaminado deben ser tomadas luego de un tiempo prudencial al derrame, debido a que gran parte de la fracción volátil de los hidrocarburos ya no estará presente.
3. De ser posible, se debe contar con una cámara de flujo laminar exclusiva para este trabajo, de manera que se elimine las probabilidades de contaminación con otros hongos o microorganismos.
4. Desarrollar la investigación *ex-situ* con volúmenes altos de suelos contaminados.

CAPÍTULO VI

6. RESUMEN

El Centro de Servicios y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA), a través del Ministerio del Ambiente presentó un proyecto cuyo objetivo fue demostrar que, usando el hongo *Pleurotus ostreatus* como alternativa para remediar suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, mejoran los tiempos de biorremediación, dada la capacidad de éste para producir enzimas ligninolíticas que degradan hidrocarburos.

Se utilizó suelo contaminado de la zona del derrame, como inóculo se utilizó cepas de *Pleurotus ostreatus* var. florida, y el tratamiento fue *ex-situ* en los laboratorios de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).

Se aplicó métodos deductivo y experimental, el análisis estadístico se realizó con ADEVA y prueba de Tukey para determinar concentraciones óptimas.

Se determinó la concentración de hidrocarburos totales de petróleo (TPH), mediante técnicas cromatográficas, antes y después del tratamiento con el hongo.

Se utilizaron muestras esterilizadas y se inocularon con 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 g de masa fúngica en 3000g de sustrato respectivamente, logrando bajar entre 94,5 - 97,5% de TPH en dos meses y con una eficiencia del proceso de 95.5% - 97.5%.

Se utilizaron además muestras no esterilizadas, que fueron inoculadas con 4, 7, 11 y 17 % en volumen de inóculo, bajando los TPH entre 95.2% – 96.7%, con una eficiencia del proceso de 95% - 97% también en un lapso de dos meses.

Estos resultados demuestran la eficiencia de este método de biorremediación, que utiliza como inóculo el hongo *Pleurotus ostreatus*, que se lo obtiene de sustratos considerados como residuos de la actividad agrícola, para remediar los suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, generando en los habitantes de la zona un beneficio social, económico y ambiental.

SUMMARY

The Service and Environmental Technology Transference Center (CESTTA), through the Environment Ministry presented a Project whose objective was to demonstrate that using the fungus *Pleurotus ostreatus* as an alternative to remediate the contaminated soils with oil hydro-carbides improves the bioremediation times, given its capacity to produce ligninolytic enzymes which degrade the hydrocarbides.

The contaminated soil of the spill zone was used . As an inoculating ingredient strains of *Pleurotus ostreatus* var. florida. The treatment was *ex-situ* in the laboratories of the Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).

The deductive and experimental methods were applied; the statistical analysis was carried out with ADEVA and the Tukey test to determine optimum concentrations.

The concentration of total oil hydro-carbides (TPH) was determined through the chromatographic techniques before and after the fungus treatment.

Sterile samples were used and were inoculated with 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0g fungus mass in 3000g substrate respectively diminishing between 94.5 - 97.5% TPH in two months with a process efficiency of 95.5% - 97.5%.

Non sterile samples which were inoculated with 4, 7, 11 and 17% in inoculating ingredient volume, diminishing the TPH between 95.2% - 96.7% with a process efficiency of 95% - 97%, also in a two-month period.

These results show the efficiency of this bioremediation method which uses the inoculating ingredient fungus *Pleurotus ostreatus* obtained from the substrates considered as residues of the agricultural activity to remediate contaminated soils with oil hydro-carbides generating in the people of the zone a social, economic and environmental benefit.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

1. ADENIPEKUN, C. and FASIDI, I. Bioremediation of oil-polluted soil by *Lentinus subnudus*, a nigerian white-rot fungus. African Journal of Biotechnology. Nigeria. no. 4, pp. 796-798. Junio de 2005.
2. AGEMATU, H.; et al. Oxidative decarboxilation of 4-hydroximandelic acid and 2-(-4-hydroxyphenyl)glycine by laccase from *Trachyderma tsunodae* and *Myrothecium verrucaria*. Biosci. Biotechnol. and Biochem. USA. no. 57, pp. 1877-1881. Noviembre de 1993.
3. ALCALDE, M.; BULTER, T. and HAROID F. Colorimetric assays for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases. Journal of Biomolecular Screening. USA. no. 7, pp. 537-543. Febrero de 2002.
4. ATLAS, R. and BARTHA, R. Fate and effects of polluting petroleum in the marine environment. Residue Rev. USA. no. 49, pp. 49-50. Mayo de 1973.
5. AWASTHI, N.; MANICKKAM, N. and KUMAR, A. Biodegradation of endosulfan by a bacterial coculture. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. USA. no. 59, pp. 928-934. Septiembre de 1997.

6. BALDRÍAN, P. et al. Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Applied and Environm. Microbiol.* USA. no. 66, pp. 2471-2478. Junio de 2000.
7. BALDRÍAN, P. Interactions of heavy metals with white rot funji. *Enzyme and Microbial Technology.* USA. no. 32, pp. 78-91. Enero de 2003.
8. BALDRÍAN, P. and GABRIEL, J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters.* USA. no. 206, pp. 69-74. Enero de 2002.
9. BALDRÍAN, P. and GABRIEL, J. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. *FEMS Microbiology Letters.* USA. no. 220, pp. 235-240. Mayo de 2003.
10. BARTHA. *Ecología microbiana y microbiología ambiental.* 3a. ed. Madrid, Pearson Education. 2002. pp. 255-261.
11. BENAVIDES LÓPEZ DE MESA, J. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova. Colombia.* no. 4, pp. 82-90. Junio de 2006.
12. BEZALEL, L.; HADAR, Y. and CERNIGLIA, C.E. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology.* USA. no. 62, pp. 292-295. Enero de 1996.
13. BOLLAG, J. and LEONOWICZ, A. Comparative studies of extracellular fungal laccase. *Applied and Environ. Microbiology.* USA. no. 48, pp. 849-854. Octubre de 1984.

14. BOURBONNAIS, R. et al. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol. USA.* no. 61, pp. 1876-1880. Mayo de 1995.
15. BUCKMAN, H. *Naturaleza y propiedades de los suelos.* 5a. ed. México, Limusa. 1985. pp. 12, 52-56, 74-80, 104, 375.
16. CERNIGLIA, E. C. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation. Netherlands.* no. 3, pp. 351-368. Septiembre de 1992.
17. CENTRO DE SERVICIOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos y metales pesados derivados del petróleo del campamento sacha 161 utilizando el hongo *Pleurotus ostreatus*. pp. 1-5. 2009. (Documento de trabajo).
18. COHEN, R.; PERSKY, L. and HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnol. USA.* no. 58, pp. 582-594. Febrero de 2002.
19. **CHIU, SIU-WAI et al.** Removal of spilled petroleum in industrial soils by spent compost of mushroom *Pleurotus pulmonarius*. *Chemosphere. China.* no. 75, pp. 837-842. Mayo de 2009.
20. DÁVILA, G. y VÁZQUEZ-DUHALT R. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. México. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 1998. pp. 32-43.

21. DE LEÓN-MONZÓN, J.H.; SÁNCHEZ, J. E. y NAHED-TORAL J. El cultivo de *Pleurotus ostreatus* en los altos de Chiapas, México. Rev. Mex. de Micología. Méx. no. 18, pp. 31-38. Julio de 2004.
22. DHAR, B.L. et al. Organic mushroom production through improved substrate fermentation process and cultural practices. Mushroom Science. USA. no. 16, pp. 289-295. Julio de 2004.
23. DONOSO, C. Influencia de la luz en la composición lipídica y proteica del *Pleurotus ostreatus* var. florida. Tesis en Magíster en Biotecnología. Riobamba. Escuela de Postgrado y Educación Continua. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. pp. 24. 1999.
24. DORN, B.P. et al. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microox, and plants. Chemosphere. USA. no. 57, pp. 845-860. Febrero de 1998.
25. ECUADOR. DECRETO EJECUTIVO RAOHE 1215. pp. 57. Febrero de 2001.
26. EGGEN, T. and MAJCHERCZYK, A. Removal of polycyclic hydrocarbons (PAHs) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. International Biodeterioration and Biodegradation. USA. no. 41, pp. 111-117. Septiembre de 1998.
27. EWEIS, J. y otros. Principios de biorrecuperación. España. Mc Graw-Hill/Interamericana. 1999. pp. 2, 27-31, 37, 38, 41, 65,132.
28. FIELD, J. White rot fungi.
<http://www.ftns.wau.nl/imb/research/wrf.html>
20090701

29. FLORES HERRERA O, y otros. Mensaje bioquímico. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 2006. vol. 30. pp. 35-36.

30. FRAZAR, C. Bioremediation and phytoremediation of pesticides contaminated sites. Prepair for US Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response, Technology Innovation Office. USA. pp. 127-136. 2000.

31. GAVILANES, V. y PAREDES, A. Biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos por derrame de la línea de flujo del pozo sachá-161 mediante biopilas. Tesis en Ing. en Biotecnología Ambiental. Riobamba. Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. pp. 77-78. 2009.

32. GIANFREDA, L.; XU, F. and BOLLAG, J. M. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. Bioremediation Journal. UK. no. 3, pp. 1-25. Enero – Marzo de 1999.

33. GUILLÉN-NAVARRO, G.; MÁRQUEZ-ROCHA, F.J. y SÁNCHEZ-VÁZQUEZ J. E. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. Rev. Iberoam. Micol. España. no. 15, pp. 302-306. Octubre de 1998.

34. HERNÁNDEZ, D.; SÁNCHEZ, J.E. and YAMASAKI, V.K. Composting, a simple procedure for preparing substrate for cultivation of *Pleurotus ostreatus*. Bioresource Technology. México. no. 90, pp. 145-150. Noviembre de 2003.

35. KATHIA, J. y RODRÍGUEZ, R. Eficacia del hongo *Pleurotus ostreatus* como biorremediador de ...
<http://www.grad.uprm.edu/tesis/rodriguezrosario.pdf>
 20090611

36. KESLEY, J.; KOTTER, B. and ALEXANDER, M. Selective chemical extractant to predict bioavailability of soil aged organic chemicals. Environm. Sci. Technol. USA. no. 31, pp. 214-217. Diciembre de 1996.
37. KOTTERMAN, M. and FIELD, J. (2003). White rot fungi. Bioremediation research.
<http://www.ftns.wau.nl/imb/research/wrf/xeno.html>
20090705
38. KUBATOVA, A. et al. PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil. Chemosphere. Czech Republic. no. 43, pp. 207-215. Marzo de 2001.
39. LEONOWICZ, A.; EDGEHILL, R. U. and BOLLAG, J. M. The effect of pH on the transformation of syringic and vanillic acids by the laccases of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*. Arch. of Microbiol. USA. no. 137, pp. 89-96. Marzo de 1984.
40. LEONOWICZ, A. et al. Fungal laccase: properties and activity on lignin. Journal of Basic Microbiol. USA. no. 41, pp. 185-227. Julio de 2001.
41. LI, K.; HELM, R. and ERIKSSON, K. Mechanistic studies of the oxidation of a non-phenolic lignin model compound by the laccase/1-hydroxybenzotriazole redox system. Biotechnology and Appl. Biochem. Great Britain. no. 27, pp. 239-243. Junio de 1998.
42. LI, X.; FENG Y. and N. SAWATSKY. Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. PlantSoil. Canada. no. 192, pp. 227-236. Abril de 1997.

43. MÁRQUEZ, F.; HERNÁNDEZ, V. and VÁZQUEZ, R. Biodegradation of soil absorbed polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology Letters*. USA. no. 22, pp. 469-472. Enero de 2000.
44. MARTENS, R. et al. Mineralization of C-labelled highly-condensed polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by *Pleurotus* sp. florida. *Soil Biology and Biochemistry*. USA. no. 31, pp. 1893-1899. Noviembre de 1999.
45. MARTÍN, C.; GONZÁLEZ, A. y BLANCO, M.J. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por ...
www.reviberoammicol.com/2004-21/103120.pdf - 20090428
46. MARTIRANI, L. et al. Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research*. Italia. no. 30, pp. 1914-1918. Agosto de 1996.
47. MASTRANGELO, G.; FADDA, E. and MARZIA, V. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environmental Health Perspect.* Italia. no. 104, pp. 1166-1170. Noviembre de 1996.
48. MINISTERE DEL'ENVIONNEMENT DU QUEBEC. Problematique des sois et des eaux souterraine' et par des produits petrolier. Can. 1993. pp. 89.
49. PETRÓLEOS MEXICANOS. Breviario de términos y conceptos sobre ecología y protección ambiental. México. **Ducere SA**. 1986. pp. 301.
50. PLAZA, G. y otros. Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente*. Argentina. no. 5, pp. 163-167. Agosto de 2001.

51. POTHULURI, V.J. and CERNIGLIA E.C. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. Netherlands. no. 22, pp. 425. Febrero de 1994.
52. POTTHAST, A. et al. Selective enzymatic oxidation of aromatic methyl groups to aldehydes. The Journal of Org. Chem. De. no. 60, pp. 4320-4321. Julio de 1995.
53. QUIMIO, T. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. México. Sanchez and Royse. 2002. pp. 25-30.
54. RAMOS, G. *Pleurotus ostreatus* cultivado en residuos de palma aceitera como importante fuente proteica para la dieta humana. Tesis en Ing. en Biotecnología Ambiental. Riobamba. Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. pp. 17-25. 2007.
55. REINHAMAR, B. Laccase Enzyme: Copper proteins and copper enzymes. Vol. 3. USA. R. Lontie. 1984. pp 1-35.
56. RESTREPO, R. Derrame de hidrocarburos. Impacto en los ecosistemas tropicales. ECOPETROL Instituto Colombiano de Petróleo. Colombia. Profitecnicas Ltda. 2002. pp. 71.
57. REYES, P.; PICKARD, M. and VAZQUEZ-DUHALT, R. Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dye decolorization by immobilized laccase. Biotechnology Letters. Netherlands. no. 21, pp. 875-880. Agosto de 1999.
58. RINKER, D. L. Handling and using "spent" mushroom substrate around the world. México. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 2002. pp. 43-60.

59. RIVERA, C.M. Microorganismos rizosféricos de los pastos alemán [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.j y cabezón (*Paspalum vírgatum* L.) en la degradación del petróleo crudo y el benzo(a)pireno. Tesis de Doctorado en Ciencias en Edafología. Montecillo, Colegio de Postgraduados. México. pp.348. 2001.
60. RODRÍGUEZ, E.; PICKARD, M. and VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi. *Curr. Microbiol. México.* no. 38, pp. 27-32. Enero de 1999.
61. SÁNCHEZ, J. y ROYSE, D. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. México, DF. UTEHA – ECOSUR. 2002. pp. 141-156.
62. SANJEET, M. et al. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology.* India. no. 67, pp. 1675-1681. Febrero de 2001.
63. SHAH, V. and NERUD, F. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Canadian Journal of Microbiology.* Can. no. 48, pp. 857-870. Octubre de 2002.
64. STELIGA, T.; JAKUBOWICZ, P. and KAPUSTA, P. Optimisation research of petroleum hydrocarbon biodegradation in weathered drilling wastes from waste pits. *Waste Management Research.* Poland. no. 28, pp. 1065-1075. Diciembre de 2010.
65. SULLIA, S. (2003). Fungal Diversity and Bioremediation.
http://www.fbae.org/channels/general_issues/fungal_diversity_and_bioremediat.htm
20090507

66. VACCHINA, V. et al. Investigation of the response of wood rotting fungi to copper stress by size exclusion chromatography and capillary zone electrophoresis with ICP MS detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. USA. no. 372, pp. 453-456. Diciembre de 2001.
67. VANDERTOL-VANIER, H. et al. Enhanced activity by poly (ethylene glycol) modification of *Coriolopsis gallica* laccase. *Journal of Ind. Microbiology and Biotechnology*. USA. no. 29, pp. 214-220. Julio de 2002.
68. WARD, O. *Biología de las fermentaciones*. España. Acribia. 1989. pp. 125.
69. YAMBAY, W. Aprovechamiento biotecnológico de los residuos de quinua mediante el cultivo de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*). Tesis en Doctorado en Química. Riobamba. Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. pp. 56. 2000.

CAPÍTULO VIII

8. ANEXOS

ANEXO No 1.

TABLA No. 8: RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE NUTRIENTES

No MUESTRA	Ph	% N	P total mg/Kg	P asimilable meq/100g	K Asimilable meq/100g	K Total mg/Kg
1	5,87	0,089	2250	11,0	0,157	1025
2	6,60	0,060	1578	5,5	0,162	784
3	6,42	0,052	2050	8,9	0,152	1100
4	6,71	0,059	2490	8,9	0,089	788
5	6,64	0,093	3154	11,87	0,225	1223
6	6,54	0,049	916	4,4	0,173	854
7	5,85	0,082	2258	10,9	0,068	1356
8	6,10	0,126	1542	3,3	0,099	845
9	6,18	0,232	1617	3,6	0,085	729
10	6,21	0,048	4002	11,321	0,164	945
11	6,63	0,102	2738	10,36	0,153	1987
12	6,39	0,139	1987	10,4	0,234	1003
13	6,17	0,115	1974	7,9	0,209	1654
14	7,04	0,077	1890	5,4	0,047	984
15	6,43	0,074	2290	7,8	0,054	544
16	6,48	0,053	4694	10,2	0,195	1422
17	6,79	0,058	2192	8,69	0,266	984
18	6,47	0,108	1642	4,9	0,225	984
19	6,49	0,052	1930	8,8	0,194	647
20	6,63	0,098	2910	12,4	0,140	1114

ANEXO No 2.

TABLA No. 9: RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE TEXTURA DEL ÁREA A REMEDIAR

No MUESTRA	% de arena	% limo	% de Arcilla	Textura	% Materia Orgánica
1	30	48,00	2	FRANCO LIMOSO	4,060
2	28	52,00	4	FRANCO LIMOSO	6,050
3	30	50,00	6	FRANCO LIMOSO	6,530
4	34	46,00	2	FRANCO LIMOSO	4,240
5	30	54,00	4	FRANCO LIMOSO	6,040
6	28	58,00	2	FRANCO LIMOSO	4,380
7	26	60,00	4	FRANCO LIMOSO	6,040
8	32	64,00	2	FRANCO LIMOSO	6,060
9	26	56,00	2	FRANCO LIMOSO	7,030
10	32	66,00	2	FRANCO LIMOSO	4,880
11	28	56,00	4	FRANCO LIMOSO	5,740
12	30	54,00	2	FRANCO LIMOSO	7,030
13	32	64,00	4	FRANCO LIMOSO	5,060
14	34	62,00	2	FRANCO LIMOSO	4,050
15	38	58,00	4	FRANCO LIMOSO	5,010
16	28	60,00	2	FRANCO LIMOSO	6,020
17	32	56,00	4	FRANCO LIMOSO	5,040
18	26	62,00	2	FRANCO LIMOSO	7,900
19	38	56,00	6	FRANCO LIMOSO	7,700
20	28	58,00	4	FRANCO LIMOSO	5,400

ANEXO No 3.

CUADRO No. 1 RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE TPH DE MUESTRAS ESTERILIZADAS

TPH DE MUESTRAS ESTERILIZADAS			
FECHA	CONCENTRACIÓN	TPH	DIAS
16-mar-10		107239,48	0
23-mar-10	B	26367,87	7
	C1	32922,46	
	C2	20391,76	
	C3	16413,47	
	C4	20888,25	
30-mar-10	B	19400,91	7
	C1	11044,23	
	C2	15388,01	
	C3	10536,34	
	C4	14318,68	
06-abr-10	B	15235,2	7
	C1	9969,54	
	C2	14780,84	
	C3	9246,9	
	C4	12217,82	
13-abr-10	B	7750,74	7
	C1	9368,54	
	C2	10787,65	
	C3	9609,9	
	C4	11602,28	
11-may-10	B	4788,42	30
	C1	5939,67	
	C2	5163,42	
	C3	3337,74	
	C4	2729,22	
			58 días

ANEXO No 4.

CUADRO No. 2 RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE TPH DE MUESTRAS NO ESTERILIZADAS

TPH DE MUESTRAS NO ESTERILIZADAS			
FECHA	CONCENTRACIÓN	TPHs	DÍAS
28-oct-10	B	31717,22	0
08-nov-10	B	25884,56	7
	C1	11971,52	
	C2	18502,97	
	C3	9970,65	
	C4	10942,71	
15-nov-10	B	34170,58	7
	C1	8111,37	
	C2	15189,52	
	C3	6925,34	
	C4	8840,51	
22-nov-10	B	24628,43	7
	C1	5929,26	
	C2	7647,07	
	C3	4804,65	
	C4	4364,07	
29-nov-10	B	27866,09	7
	C1	3851,02	
	C2	5680,85	
	C3	3822,39	
	C4	1772,72	
06-dic-10	B	26632,92	7
	C1	2898,11	
	C2	5020,93	
	C3	2708,92	
	C4	2028,19	
13-dic-10	B	22576,64	7
	C1	1602,23	
	C2	2115,51	
	C3	1510,12	
	C4	1316,44	
20-dic-10	B	15742,19	7
	C1	1520,63	
	C2	1481,48	
	C3	1058,07	
	C4	1045,25	
			49

ANEXO No 5. FOTOGRAFÍAS



FOTOGRAFÍA A: PESO DEL SUSTRATO HÚMEDO EN PREPARACIÓN DE INÓCULOS



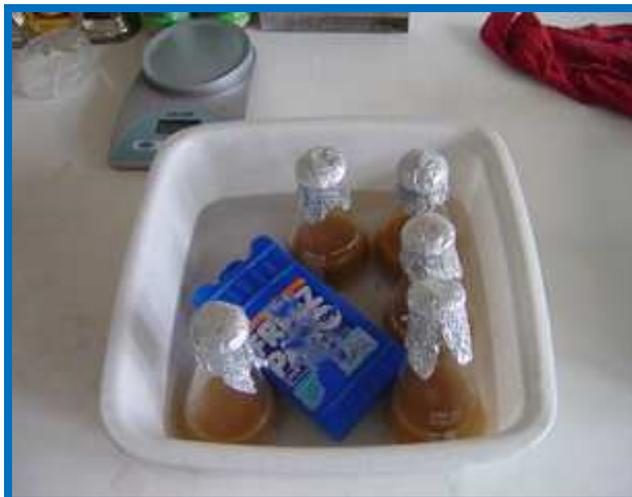
FOTOGRAFÍA B: EQUIPO PARA ESTERILIZACIÓN EN PREPARACIÓN DE INÓCULOS



FOTOGRAFÍA C: PREPARACIÓN DE LAS CAJAS EN PRUEBAS PRELIMINARES



FOTOGRAFÍA D: AGITACIÓN DEL INÓCULO FÚNGICO EN MEDIO LÍQUIDO



FOTOGRAFÍA E: PASTEURIZACIÓN DE LAS MUESTRAS



FOTOGRAFÍA F: INOCULACIÓN



FOTOGRAFÍA G: CRECIMIENTO DE UN INÓCULO FÚNGICO EN MEDIO LÍQUIDO



FOTOGRAFÍA H: DISPOSICIÓN DE LAS FUNDAS PARA INCUBACIÓN



FOTOGRAFÍA I: TANQUE PARA PREPARACIÓN DEL SUSTRATO



FOTOGRAFÍA J: PREPARACIÓN DEL SUSTRATO



FOTOGRAFÍA K: PREPARACIÓN DEL SUSTRATO



FOTOGRAFÍA L: SUELO INOCULADO