



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
SEDE ORELLANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA INGENIERÍA AMBIENTAL

BIORREMEDIACIÓN DE MUESTRAS DE SUELO
CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS TOTALES DE
PETRÓLEO (TPH).

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO AMBIENTAL

AUTORES:

LIZETH GABRIELA IZA BÓSQUEZ

GEMA KAROLINA VERA SÁNCHEZ

DIRECTORA: ING. SANDRA ELIZABETH SUÁREZ CEDILLO, Mgtr.

El Coca – Ecuador

2023

© 2023, Lizeth Gabriela Iza Bósquez & Gema Karolina Vera Sánchez

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

Nosotras, Lizeth Gabriela Iza Bósquez y Gema Karolina Vera Sánchez, declaramos que el presente Trabajo de Integración Curricular es de nuestra autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autoras asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

El Coca, 01 de junio de 2023



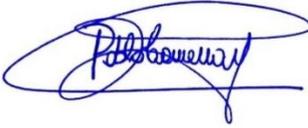
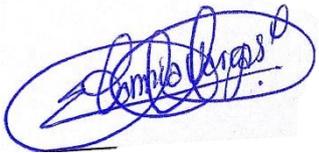
Lizeth Gabriela Iza Bósquez
2200139836



Gema Karolina Vera Sánchez
2200459390

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; tipo: Trabajo Experimental, **BIORREMEDIACIÓN DE MUESTRAS DE SUELO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (TPH)** , realizado por las señoritas: **LIZETH GABRIELA IZA BÓSQUEZ** y **GEMA KAROLINA VERA SÁNCHEZ**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Carrera Oscullo Pablo Danilo, Mgtr PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 _____	2023-06-01
Ing. Suárez Cedillo Sandra Elizabeth, Mgtr DIRECTORA DE TRABAJO DE TITULACIÓN	 _____	2023-06-01
Ing. Vargas Tierras Tannia Jazmín, Mgtr MIEMBRO DEL TRIBUNAL	 _____	2023-06-01

DEDICATORIA

A mi esposo, por ser mi apoyo incondicional quién me animó a seguir superándome; de hecho, sin su ayuda este sueño no se hubiera hecho realidad. También a mis hijos; Sophie y Daniel que me inspiran para cumplir las metas que me propongo. A mi mamá, quién ha creído en mí siempre y por cada palabra de aliento otorgada para salir adelante. A mi abuelito Eliecer Bósquez que desde el cielo me cuida y me protege, siento que estás conmigo siempre y sé que este momento hubiera sido tan especial para ti como lo es para mí. Finalmente, a mis hermanas que de una u otra forma contribuyeron para alcanzar lo anhelado.

Lizeth

Este nuevo logro de mi vida se la dedico a Dios, por darme esa fortaleza para seguir adelante sin importar los obstáculos venideros, y por rodearme de personas que hacen que me supere. A mi querida madre por estar siempre a mi lado, apoyándome, dándome las fuerzas para seguir, demostrándome ese amor de madre y de amiga, dándome la mano siempre que la necesitaba y a mi padre por todos los valores inculcados. A mis hermanos por los consejos que me impulsaron a continuar y culminar este logro importante en mi vida. Y finalmente a mis amigos por su valiosa amistad. Esta meta fue posible gracias a todos ustedes.

Gema

AGRADECIMIENTO

A Dios, por las bendiciones recibidas, bendiciéndonos y guiándonos en esta travesía y agradecidas infinitamente por permitirnos llegar a lograr nuestros propósitos. A nuestros maestros, por brindarnos sus conocimientos siendo partícipes de nuestra formación universitaria, adquiriendo una parte de sus conocimientos. A nuestra tutora de Trabajo de Integración Curricular Ing. Sandra Suárez, por su guía en la realización de esta investigación, por su calidad humana, por su tiempo y apoyo. A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo- Sede Orellana por su acogida convirtiéndose en nuestra segunda casa, por habernos permitido nuestra formación profesional. Finalmente agradecemos a quienes conforman el laboratorio LABSU, especialmente a la Ing. Viviana Lara por recibirnos con los brazos abiertos siempre ayudándonos en cualquier cosa a su alcance, al Ing. Ricardo Caicedo que, durante todo este proceso, quien con la enseñanza de su valioso conocimiento y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.

Lizeth y Gema

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	xii
SUMMARY.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPITULO I

1	DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA.....	3
1.1	Planteamiento del problema.....	3
1.2	Justificación.....	4
1.3	Objetivos.....	6
1.3.1	<i>Objetivo General</i>	6
1.3.2	<i>Objetivos Específicos</i>	6

CAPITULO II

2	MARCO TEORICO.....	7
2.1	Petróleo.....	7
2.2	Hidrocarburos.....	7
2.2.1	<i>Tipos de hidrocarburos</i>	7
2.2.1.1	<i>Hidrocarburos alifáticos</i>	7
2.2.1.1	<i>Hidrocarburos aromáticos</i>	7
2.2.2	<i>Impactos de los hidrocarburos al medio ambiente</i>	8
2.2.3	<i>Métodos para determinar Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH) en suelo</i>	9
2.3	Técnicas para descontaminar suelos con hidrocarburos.....	9
2.3.1	<i>Biorremediación</i>	10
2.3.2	<i>Microorganismos empleados para biorremediación</i>	11
2.4	Legislación Ambiental.....	13
2.4.1	<i>Acuerdo Ministerial 097-A</i>	14

CAPITULO III

3	MARCO METODOLÓGICO	15
3.1	Fase de campo	15
3.1.1	<i>Muestreo de suelo para los análisis físico-químicos</i>	15
3.2	Fase de Laboratorio	16
3.2.1	<i>Determinación de parámetros físico-químico de suelo en ausencia de hidrocarburos</i>	17
3.2.2	<i>Esterilización del suelo</i>	20
3.2.3	<i>Contaminación del suelo con hidrocarburos</i>	20
3.2.4	<i>Determinación de parámetros físico-químico del suelo contaminado con hidrocarburos totales de petróleo</i>	21
3.2.5	<i>Aplicación de la técnica de Landfarming utilizando Pseudomona fluorescens para degradar TPH</i>	21
3.2.6	<i>Monitoreo de los tratamientos</i>	26
3.2.7	<i>Análisis de varianza ANOVA de dos factores</i>	26

CAPITULO IV

4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1	Determinación de los parámetros físico – químicos del suelo en ausencia y presencia de hidrocarburos totales de petróleo.	28
4.2	Resultado de los parámetros fisicoquímicos medidos en los diferentes tratamientos en intervalos de 15, 30, 45 y 60 días.	29
4.3	Determinación de la eficiencia de la <i>Pseudomona fluorescens</i> para biodegradar los Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH)	34

CAPITULO V

5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	38
5.1	Conclusiones	38
5.2	Recomendaciones	39

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1: Técnicas establecidas e innovadoras.	10
Tabla 2-2: Parámetros que se deben considerar en la técnica de landfarming	11
Tabla 3-1: Métodos de referencia para la caracterización del suelo	16
Tabla 3-2: Disposición del diseño factorial	22
Tabla 4-1: Comparación de resultados del suelo en ausencia de hidrocarburos con el Acuerdo Ministerial 097-A.....	28
Tabla 4-2: Comparación de resultados del suelo en presencia de hidrocarburos con el Acuerdo Ministerial 097-A.....	28
Tabla 4-3: Análisis de la conductividad eléctrica.....	29
Tabla 4-4: Análisis del pH	30
Tabla 4-5: Valores del análisis de TPH.....	32
Tabla 4-6: Cuantificación de <i>Pseudomona</i>	33
Tabla 4-7: ANOVA del factor tratamiento.....	33
Tabla 4-8: ANOVA del factor tiempo.....	33
Tabla 4-9: Porcentaje de la degradación de la bacteria.....	37
Tabla 4-10: Estabilización del suelo	57
Tabla 4-11: Cuantificación al Inicio.....	70
Tabla 4-12: Cuantificación al Final.....	71

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2-1: Ruta metabólica de TPH por <i>Pseudomona</i>	13
Ilustración 3-1: Ubicación de desarrollo del Trabajo de Integración Curricular	15
Ilustración 4-1: Conductividad medido en diferentes intervalos de tiempo.	29
Ilustración 4-2: pH medido en diferentes intervalos de tiempo.....	31
Ilustración 4-3: TPH medido en diferentes intervalos de tiempo	32
Ilustración 4-4: Cuantificación al inicio y al final.	34
Ilustración 4-5: Eficiencia de <i>Pseudomona fluorescens</i> en cuatro tiempos.....	36
Ilustración 4-6: Eficiencia de <i>Pseudomona fluorescens</i> en cuatro tiempos.....	36

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: MUESTREO DE SUELO PARA ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS	46
ANEXO B: DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICO.....	47
ANEXO C: ESTERILIZACIÓN DEL SUELO.....	55
ANEXO D: CONTAMINACIÓN DEL SUELO CON HIDROCARBUROS	56
ANEXO E: ESTABILIZACIÓN DEL SUELO	57
ANEXO F: ACTIVACIÓN DE <i>PSEUDOMONA FLUORESCENS</i>	57
ANEXO G: DILUCIONES SERIADAS.....	60
ANEXO H: DISTRIBUCIÓN DEL SUELO EN LAS CAJAS	61
ANEXO I: APLICACIÓN DE LA BACTERIA <i>PSEUDOMONA FLUORESCENS</i> EN EL SUELO CONTAMINADO CON TPH.....	62
ANEXO J: INOCULACIÓN Y CONTEO DE <i>PSEUDOMONA FLUORESCENS</i>	64

RESUMEN

Uno de los problemas más preocupantes de contaminación ambiental es la liberación de hidrocarburos totales de petróleo en el suelo, aire y agua; ya que, a lo largo del tiempo éstos han venido provocando grandes desastres naturales con su toxicidad. En la presente investigación se evaluó la eficiencia de la *Pseudomona fluorescens* para biodegradar suelos contaminados por hidrocarburos; con el objetivo de disminuir los TPH (Hidrocarburos Totales de Petróleo) en el suelo. Este proyecto abordó dos fases; la fase de campo: consistió en el muestreo de suelo y la fase de laboratorio: consistió en la instalación del ensayo con un sistema 3x3 que consta de número tratamientos a tres diferentes concentraciones de *Pseudomona fluorescens* y cada tratamiento con sus tres respectivas repeticiones, con condiciones ambientales controladas como: pH y conductividad eléctrica. Se realizaron los análisis físico químicos y TPH al inicio y al final del ensayo cada 15 días durante dos meses. La contaminación con TPH inicial en el suelo fue 34792,82 mg/kg, y como resultado se obtuvo que el T1 fue el mejor tratamiento ya que fue el más eficiente, situándose dentro de los límites permisibles del Acuerdo Ministerial 097-A; demostrando que el tratamiento funciona de forma independiente, siendo T1 quién degradó más cantidad de hidrocarburo llegando a 607 mg/kg. Se demostró la eficiencia de la bacteria *Pseudomona fluorescens* para biodegradar TPH, utilizando los hidrocarburos como fuente de carbono metabolizándolos y convirtiéndolos en agua y CO₂ dado a conocer que la biorremediación es una proceso ecológico y efectivo.

Palabras clave: <BIORREMEDIACIÓN>, <PSEUDOMONA FLUORESCENS>, <HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (TPH)>, <LANDFARMING>, <SUELO>.

Cristian Tenelanda.S
26-06-2023.



Ing. Cristian Sebastian Tenelanda S.

1211-DBRA-UPT-2023

0604686709

SUMMARY

One of the most worrying environmental pollution problems is release of total petroleum hydrocarbons into the soil, air, and water; then, these have been causing great natural disasters with their toxicity. In the present research was evaluated the efficiency *Pseudomona fluorescens* to biodegrade soils hydrocarbon contaminated with aim of reducing TPH (Total Petroleum Hydrocarbons) on soil. This project addressed two phases: the field phase consisted of soil sampling and laboratory phase: consisted of the installation from trial with a 3x3 system consisting of a few treatments at three different concentrations of *Pseudomona fluorescens* and each treatment with its respective three replicates, controlled environmental conditions like: pH and electrical conductivity. Physical-chemical and TPH analyses were performed at the beginning end of trial every 15 days for two months. The initial TPH contamination on soil was 34792.82 mg/kg, and as a result it was obtained that T1 was the best treatment since it was the most efficient, being within the permissible limits of Ministerial Agreement 097-A; demonstrating that the treatment works independently, being T1 who degraded more amount of hydrocarbon reaching 607 mg/kg. The efficiency *Pseudomona fluorescens* bacteria to biodegrade TPH was demonstrated, using hydrocarbons as a carbon source, metabolizing them, and converting them into water and CO₂, showing that bioremediation is an ecological and effective process.

Keywords: <BIORREMEDICATION>, <PSEUDOMONA FLUORESCENS>, <TOTAL PETROLEUM HYDROCARBONS (TPH) >, <LANDFARMING>, <SOIL>.

Translated by:



Lic. Zoila Victoria Herrera Andrade Mgs.

DOCENTE-SEDE ORELLANA ESPOCH

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas de contaminación ambiental más graves en el mundo es la liberación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) provenientes de la carga y descarga de crudo en los puertos, exploración, producción, transporte, almacenamiento y refinación de petróleo (Vallejo et al., 2005, p.68). Además, se ha comprobado que se han producido grandes desastres naturales a lo largo de los años debido a la toxicidad de estos compuestos y al efecto que tienen sobre el medio ambiente (Valenzuela et al., 2021: p.109).

A principios de la década de 1970, Ecuador permitió el uso y exportación de petróleo, dinamizando la economía del país debido a los precios del mercado internacional del crudo, lo que provocó innumerables desastres naturales (Apunte et al., 2021: p.1). Las actividades industriales en el Ecuador han causado uno de los mayores problemas en cuanto a la contaminación del suelo (Martínez et al., 2011: p.242).

En la Amazonía ecuatoriana es muy común la contaminación por hidrocarburos, por esta razón, la recuperación del suelo es cada vez mayor y requiere el uso de métodos amigables, tales como: fitorremediación, electrorremediación, biorremediación y electrobiorremediación donde, aunque es cierto hoy en día, la información es limitada (Morante, 2018, p.8). El Ministerio del Medio Ambiente es responsable de la gestión de las emisiones de TPH mediante la evaluación de la calidad ambiental de los recursos de la tierra y el proceso de gestión de la tierra contaminada con el fin de proteger la calidad de la tierra y proteger la integridad de las personas, el medio ambiente y la unidad (Ambiente, 2016, p. 18).

Los métodos más comunes de preparación de suelos utilizados por empresas privadas en el Ecuador son métodos biológicos in situ (bioventilación, inyección de aire comprimido, liberación natural, bioestimulación y bioaumentación) y ex situ (cultivo, bioapilamiento, biorreactor) (Guartantang y Sigüencia, 2019, pp. 11-13). Algunas empresas utilizan métodos de biorremediación como: bioestimulación, bioaumentación y fitorremediación (Guartantang y Sigüencia, 2019, pp.15-20). Los microorganismos se utilizan ampliamente para remediar suelos contaminados con petróleo: hongos (*Trichoderma*, *Fusarium*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*) y bacterias (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Acinetobacter*) (Trujillo y Ramírez, 2012, p.40). Estos organismos se recolectan en el campo, especialmente en áreas antiguas de derrames o áreas cercanas; Después de eso, se prueban en el laboratorio para determinar aún más cuánto disminuyen (Morante, 2018, p.18).

La biorremediación de suelos como método efectivo de recuperación de los mismos cobra cada vez más importancia en nuestro país, esta tecnología se está utilizando, lo que la convierte en una forma gratuita de restaurar la calidad ambiental en el suelo, el éxito depende de la presencia de microorganismos en el ambiente contaminado, con un metabolismo adecuado que convierte los compuestos xenobióticos en compuestos que pueden ser devueltos al ciclo biogeoquímico (Ramírez, 2011, p.28).

CAPÍTULO I

1 DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema.

La región amazónica de Ecuador es una zona que posee cantidades elevadas de biodiversidad, desafortunadamente también es un importante reservorio de hidrocarburos. Por lo que, la contaminación de petróleo es un problema actual cuyos efectos sobre la fauna y la flora son perceptibles tanto en ambientes naturales como antropogénicos. A menudo se informa que la contaminación por hidrocarburos cambia la estructura de la comunidad microbiana y disminuye la diversidad del mismo (Garcés et al., 2018: pp.1-2).

Por ello, este trabajo experimental es de utilidad en la biorremediación de suelos, donde se investigará la biodegradación de los hidrocarburos de petróleo (TPH) por parte de *Pseudomona fluorescens*, una bacteria conocida por su capacidad para disolver el fósforo y destruir la materia orgánica (Beltrán, 2015, p.102).

A lo largo del desarrollo de la industria, los métodos utilizados para la extracción de petróleo afectan el medio ambiente debido al mal manejo de los equipos, por lo que es importante utilizar un método adecuado para proteger y restaurar los terrenos afectados, porque la contaminación del suelo durante la exploración, uso y producción de petróleo y sus fuentes provoca cambios físicos y químicos en el suelo (Pinto y Sánchez ,2018, p.14).

Los procesos orgánicos naturales se llevan a cabo con la ayuda de bacterias en el suelo, que descomponen los hidrocarburos en nutrientes, purificando así el suelo. Este estudio intenta sintetizar el suelo contaminado con estos químicos utilizando cepas de bacterias de laboratorio, para evaluar su efectividad (Pinto y Sánchez, 2018, p.14). Ahora bien, sabiendo que estas bacterias degradan los hidrocarburos en suelos, se busca saber:

¿*Pseudomona fluorescens* es eficiente en el proceso de biodegradación en suelos contaminados de hidrocarburos?

1.2 Justificación

Los hidrocarburos en el suelo imposibilitan el intercambio de gases con el aire. Durante la transformación del petróleo vertido al medio ambiente, se producen diversos cambios físicos, biológicos y químicos (Enriquez, 2022, pp.18-19). También se dice que la contaminación del suelo con hidrocarburos es un problema del que no se habla y pocas veces se tiene en cuenta, aunque existen diferentes métodos de reducción (Bellido, 2018, p.56). Este modelo de contaminación se produce por factores principales, como son los riesgos asociados al colapso de oleoductos que transportan diversos tipos de hidrocarburos, en especial los derrames de petróleo, que pueden afectar el agua, el suelo y muchas veces el aire (Ordóñez, 2019, p.12).

Debido a la abundancia de químicos y sus usos, el petróleo es el combustible más consumido en el mundo, aunque en 2016 hay cerca de 100 países productores de crudo, Rusia encabezaba la lista con 10,5 millones de barriles diarios, en los primeros tres meses Arabia Saudita 10 millones y EE.UU. 9,2 millones de barriles, actualmente hay una lista de países con mayor producción de petróleo, encabezada por EE.UU, seguida de Arabia Saudita, Rusia y Canadá en barriles de 580, 560, 547 y 240 respectivamente, y en 2017 el 49° del mundo, integrado por cinco países: Rusia 13%, Arabia Saudita 13%, EE. UU. 12%, Irak 6% e Irán 5% (Pinto y Sánchez, 2018, p.20).

En Ecuador, al día se produce actualmente una cantidad aproximadamente de 532218,47 barriles de petróleo (Pinto y Sánchez, 2018, p.20). Esta producción es la más importante en la economía nacional y social desde 1972, por lo que la economía mundial se sustenta en gran medida con la extracción de hidrocarburos, el Ecuador, presenta problemas de contaminación ocasionados por las actividades petroleras que se realizan en la Amazonía, por ello el avance de las nuevas tecnologías ha hecho hincapié en el desarrollo y uso de nuevos métodos de recuperación, como el uso de agentes biológicos (Pinto y Sánchez, 2018, p.20).

En el caso de suelos contaminados con hidrocarburos, los que se volatilizan se convierten en compuestos alifáticos, mientras que están los presentes químicamente son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), los cuales causan daños al medio ambiente y a los organismos causantes de toxicidad y persistencia, la biorremediación es una tecnología efectiva para tratar la contaminación por TPH, ya que en muchos de los compuestos químicos que se localizan en el petróleo y sus productos son biodegradables (ATSDR, 1995, p.3).

En el segundo trimestre de 2021 la producción petrolera del país, en base a la producción total de la Empresa Pública EP Petroecuador y empresas privadas, alcanzó los 45,24 millones de barriles, equivalente a una producción diaria de miles de barriles 497,16. fue 1,4% inferior a la producción

diaria registrada entre enero y marzo de 2021 y 40,8% superior a la producción del segundo trimestre de 2020 (BCE, 2021, p.2).

Finalmente, la biorremediación no ha perdido interés e importancia; pero por el contrario, la Constitución Política del Ecuador “2008” reconoce que “la naturaleza tiene derecho a devolver” (artículo 72), por lo que la reforma agraria puede ser considerada una política de gobierno que debe ser atendida (Morante, 2018, p.56).

Hipótesis

Hipótesis nula

Pseudomona fluorescens no degrada hidrocarburos totales de petróleo (TPH).

Hipótesis alternativa

La bacteria *Pseudomona fluorescens* degrada hidrocarburos totales de petróleo (TPH).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General:

Biorremediar muestras de suelos contaminados con Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH), mediante la técnica de Landfarming utilizando la bacteria *Pseudomonas fluorescens*.

1.3.2 Objetivos Específicos:

- Determinar los parámetros físico-químicos en las muestras de suelo en ausencia y presencia de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) y comparar con el Acuerdo Ministerial 097-A.
- Utilizar la técnica de Landfarming como método de biorremediación de suelos contaminados con Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH).
- Determinar la eficiencia de *Pseudomonas fluorescens* para biodegradar los Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH) mediante la medición de la concentración de TPH en diferentes intervalos de tiempo.

CAPITULO II

2 MARCO TEORICO

2.1 Referencias Teóricas

2.1.1 *Petróleo*

El petróleo es una sustancia natural no renovable resultante de la descomposición anaeróbica de la materia orgánica durante un largo período de tiempo y en determinadas condiciones climáticas, está formado por varios tipos de hidrocarburos como lo son los hidrocarburos alifáticos (saturados e insaturados) e hidrocarburos aromáticos (benceno, tolueno y naftalina) (Pozo, 2018, p.7). En general, la composición del petróleo tiene diferentes contenidos: carbono 85-90 %, hidrógeno 10-15 %, oxígeno 0-1,5 %, azufre 0,1-3,0 %, nitrógeno 0,1-0,5 % y metales como níquel y vanadio, dependiendo del área donde se produzca el crudo, se encontrará más proporción de unos u otros compuestos (Ramírez, 2011, pp.12-13).

2.1.2 *Hidrocarburos*

Los hidrocarburos son compuestos constituidos solamente por átomos de carbono (C) e hidrógeno (H), la formación molecular consta de átomos de carbono unidos a átomos de hidrógeno, estas partes pueden estar en forma gaseosa, líquida o sólida, además un dato importante es que tiene una fuente esencial como son alcanos, sus moléculas que son tóxicas, químicas y altamente explosivas, también, los hidrocarburos del crudo y sus productos se pueden dividir en dos grupos: hidrocarburos alifáticos e hidrocarburos aromáticos (Jiménez, 2021, p.6).

2.1.2.1 *Tipos de hidrocarburos*

- *Hidrocarburos alifáticos*

Los hidrocarburos alifáticos son una mezcla de cadenas abiertas que se dividen en tres grupos según el enlace entre los dos átomos de carbono: alcanos (enlace simple), alquenos (enlace doble) y alquinos (enlace triple), los más conocidos son los compuestos alcanos y se encuentran en el petróleo crudo, su clasificación es: saturados e insaturados (Solano, 2019, p.40).

Hidrocarburos saturados

Los hidrocarburos saturados tienen cuatro enlaces simples de carbono, incluido el metano (CH₄), pero tienen enlaces químicos débiles y enlaces σ en su estructura, muestran que son muy estables,

sus acciones se realizan en intercambio y son muy fuerte, muchos de los hidrocarburos provienen del carbón, el petróleo y el gas natural (Vélez, 2020, p.30).

Hidrocarburos no saturados

Los hidrocarburos insaturados con uno o más dobles enlaces se denominan alquenos, y los que tienen dos o tres enlaces se denominan alquinos, los alquenos y los alquinos se denominan insaturados, ya que no tienen el mismo número de átomos de hidrógeno, es decir, cuando están saturados con hidrógeno, debido a su inestabilidad, los alquenos y los alquinos son más utilizados que los alcanos, se combinan fácilmente con otros productos químicos o por sí mismos (Solano, 2019, p.40).

- **Hidrocarburos aromáticos**

Los hidrocarburos aromáticos tienen una composición compleja, esta parte contiene moléculas con uno o más anillos bencénicos en su estructura, así hallamos hidrocarburos cíclicos relacionados con el benceno, estos compuestos tienen al menos un anillo de 6 átomos de carbono, y se dividen en monocíclicos y policíclicos (Herzka et al., 2020: p.11).

Hidrocarburos aromáticos monocíclicos

Los hidrocarburos aromáticos monocíclicos son aquellos que se basan en el anillo de benceno y se localiza a gran altura por encima y por debajo del agua subterráneas ya que estas son insolubles, por otro lado, también se puede decir que estos compuestos se han encontrado en agua dulce y agua salada (Suárez, 2013, p. 20).

Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son aquellos que se encuentran compuestos por dos o más anillos bencénicos con un anillo que comparte dos átomos de carbono entre sí, estos hidrocarburos están ampliamente disponibles en el medio ambiente y se encuentran en el agua potable, por otro lado, se producen los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) con calor insuficiente de recursos naturales, fuentes naturales y antropogénicas (Herzka et al., 2020, p. 269).

2.1.3 Impactos de los hidrocarburos al medio ambiente

Los hidrocarburos se producen en el medio ambiente en accidentes industriales o como materiales para su uso comercial o por empresas privadas, cuando se vierte o se deja caer directamente en el agua, algunas partículas permanecen en la superficie, formando un delgado haz flotante, las

partículas restantes, a menudo gruesas, se acumulan en el fondo del sedimento, afectando a la biota existente ya otros depredadores bentónicos (Goya, 2015,p.7).

En términos de suelo, los efectos principales ambientales de la contaminación por hidrocarburos son: reducción o prevención del desarrollo de cobertura vegetal en el área de disposición, cambios en la fuerza animal, además de agentes biológicos y parásitos por ingreso a las aguas subterráneas (Ñustez, 2012, p.3).

La suma de petróleo al suelo ocasiona un aumento de carbono, lo que se traduce en un aumento significativo de las relaciones C/N y C/P, “debido a la alta salinidad que representa el petróleo, que produce un alto nivel de puede conducir a la destrucción de la estructura de la formación superior de proteínas, desnaturalizando enzimas y deshidratando células”, en función del potencial de hidrógeno (pH) disminuye debido a la acumulación de carbono orgánico y la formación de ácidos orgánicos; alto Mn y Fe intercambiable (Apunte y Tuquerres, 2021,p.7).

2.1.4 Métodos para determinar Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH) en suelo

Existen diferentes métodos de prueba para medir TPH, entre ellos se encuentran: Cromatografía de gases, métodos gravimétricos y espectroscopia infrarroja, además, se pueden encontrar diferentes sustancias debido a los solventes utilizados en cada método, pasos conocidos para identificar TPH en suelo contaminado: extracción, cuantificación y detección (Apunte y Tuquerres, 2021, p.5).

2.1.5 Técnicas para descontaminar suelos con hidrocarburos

Las técnicas de tratamiento se dividen en dos grupos: los convencionales o establecidos y los innovadores para destruir los desechos o reducir la cantidad de contaminantes presentes en el sitio para que no causen daño, como se puede apreciar en la tabla 2-1 (Suárez, 2013, p.10).

Tabla 2-1: Técnicas establecidas e innovadoras.

Técnicas tradicionales para descontaminar suelos con hidrocarburos	
Técnicas establecidas	Técnicas innovadoras
Incineración	Extracción de vapores del suelo
Mezclar, enterrar y cubrir	Aspersión de aire
Dispersión sobre el terreno	Desorción térmica
Solidificación	Deshalogenación química
Re-uso y Reciclado	Enjuague del suelo in situ
	Extracción con solvente
	Medidas Fitocorrectivas
	Biorremediación

Fuente: Suárez, 2013

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

2.1.6 Biorremediación

La biorremediación es aquella restauración del medio ambiente mediante que elimina los desechos orgánicos mediante la acción de microorganismos (Parra,2014,.25). En este proceso, los contaminantes orgánicos sufren una biotransformación porque, por regla general, los microorganismos pueden utilizarlos para su crecimiento como fuente de carbono y energía, y si no pueden crecer en ellos, pueden seguir cambiando en presencia del sustrato de altura (Rios, 2012, p.15).

2.1.6.1 Landfarming

Durante el proceso de biorremediación, existe una tecnología conocida como landfarming, ganadería o tierras, estas son formas de recuperar los hidrocarburos del petróleo a través de la destrucción de las plantas. Uno de los métodos más comunes de biorremediación es el que consiste en la liberación controlada de hidrocarburos en la superficie de la tierra, la cual está sujeta a los métodos de remoción por siembra y riego superficial con adición de compost, con o sin adición de microorganismos (Castillo, 2009, p. 45). Los parámetros que deben considerarse para evaluar la efectividad del landfarming se encuentran relacionados en la siguiente tabla:

Tabla 2-1: Parámetros que se deben considerar en la técnica de landfarming

Características del suelo	Características del contaminante	Condiciones climáticas
Densidad microbiana	Volatilidad	Temperatura ambiental
pH	Estructura química	Lluvias
Contenido de humedad	Concentración y toxicidad	Viento
Temperatura		
Concentración de nutrientes		
Textura		

Fuente: Castillo, 2009

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

Los tratamientos del suelo contaminado implican el uso de materia orgánica para descomponer los desechos orgánicos. El proceso biológico cambia la estructura molecular de los desechos, y el grado de cambio determina si ocurre el proceso de biotransformación o mineralización. La biotransformación es la descomposición de la materia orgánica en una sustancia similar, no contaminante ni tóxica, y la mineralización es la descomposición del dióxido de carbono, el agua y los compuestos celulares (Castillo, 2009, p. 45).

Este es exactamente el “transformación metabólica de donación de electrones” en biorremediación, ya que la energía suficiente para el crecimiento microbiano se obtiene de la oxidación de sustancias reducidas, donde las enzimas microbianas provocan la transferencia de electrones, a este proceso se le llama “respiración microbiana” y es partiendo de que en las células transportadoras de electrones de las células se producen una serie de reacciones redox, el objetivo es obtener energía. La cadena comienza con un sustrato orgánico (compuestos de hidrocarburos) fuera de la célula y actúa como donante de electrones para que la actividad eléctrica de la célula termine con la descomposición y uso de la sustancia especificada (Gómez et al., 2021, p. 79).

2.1.7 Microorganismos empleados para biorremediación

Organismos tales como bacterias, levaduras y hongos producen metabolitos sobre sustratos hidrofóbicos, lo que los hace aptos para el crecimiento celular (Santos, 2020, p. 17), de todos los organismos metabolizadores de hidrocarburos varía mucho: 6,2% para hongos terrestres, 0,13% para bacterias del suelo y 0,003% para bacterias marinas (Arboleda y Bravo, 2008, pp. 33-34). Varias bacterias y hongos en el suelo utilizan hidrocarburos de petróleo como fuente de carbono en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, lo que provoca la descomposición (Rios, 2012, pp.15-16).

2.1.7.1 Bacterias degradadoras de hidrocarburos

Estos son organismos que se presentan en abundancia y diversidad, algunos de ellos son simbioses de plantas, o parásitos intracelulares de otros organismos, o pueden formar consorcios con otros organismos; por su naturaleza representan una amplia variedad de factores biológicos, ecológicos y funcionales, son los más destructivos de los organismos del suelo (Muñoz, 2016, p.16).

El género *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas spp, son bacterias bacilos Gram negativos, que integran a la subclase gamma de las Proteobacterias (López et al., 2006, p.87), además, son aerobios fuertes, oxidasa-positivos, y tienen cierta libertad de adaptación, lo que les permite adaptarse al medio en el que se encuentran, utilizando para su alimentación sustancias tan diversas como el carbono o el nitrógeno, además de un elevado trabajo de disolver fosfatos (Arango, 2019, p.28).

Este tipo utiliza una variedad de ingredientes, tanto raros como inusuales, y puede vivir en diferentes condiciones ambientales, además, es muy oblicuo y tiene la capacidad de lidiar con compuestos tóxicos como los hidrocarburos alifáticos y aromáticos (Ludeña, 2020, pp.34-35). *Pseudomonas* de biorremediación en su posición y comportamiento: *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, entre otros principales actores de la biorremediación, son efectivos hasta en un 98% para remover hidrocarburos debido a la diferencia de metabolismo y resistencia a dosis altas (Fiestas y Vásquez, 2020, p.7).

La ruta que realiza el género *Pseudomonas* spp. para la degradación de n-alcenos e hidroxilación, son catalizados por el mismo grupo de enzimas, en las bacterias las enzimas participantes son monooxigenasas, alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenas, como se muestra en la figura 2-1 (Pozo, 2018, p.75).

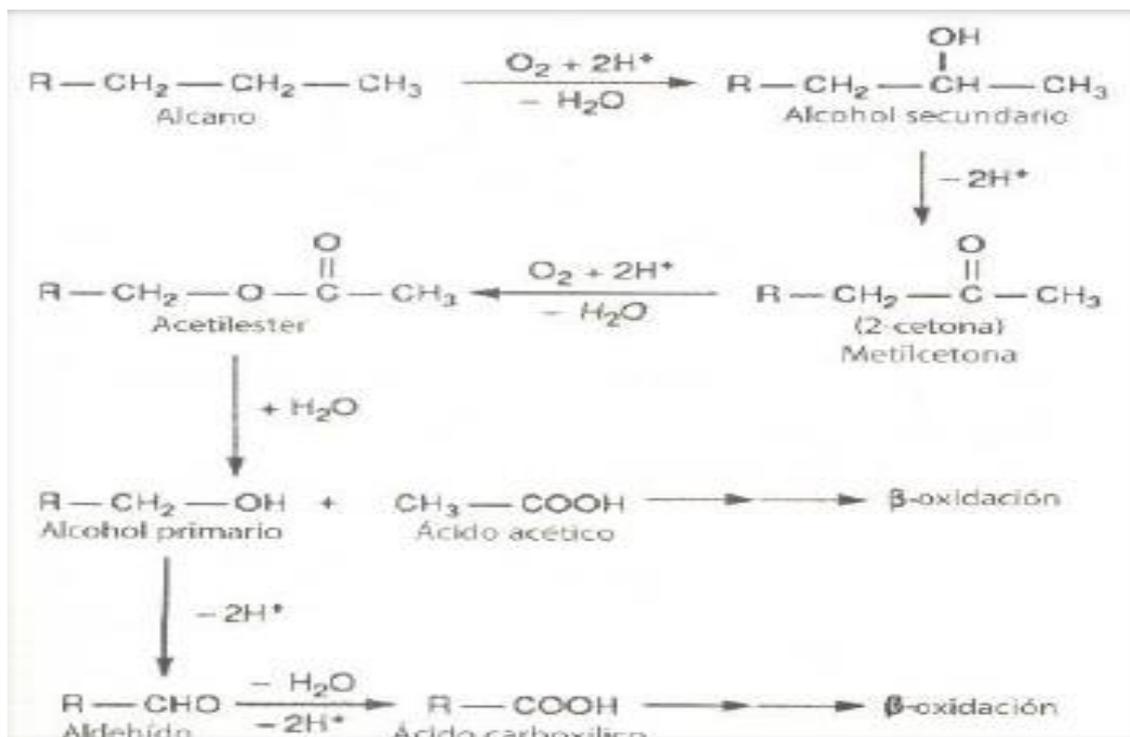


Ilustración 2-1-: Ruta metabólica de TPH por *Pseudomonas*

Fuente: Pérez, 2018

- *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens es un tipo de bacteria, Gram-negativa, tipo bacilo, ubicua e incapaz de formar esporas, de aproximadamente 0.5-1.0 μm de ancho x 1.5-5 μm largo, porque tiene muchos flagelos polares, el metabolismo de ellos es muy fuerte y se alimentan de los productos químicos derivados del petróleo, producen gránulos de polihidroxicanoato que sirven como almacén de materiales celulares, y una de las características de esta especie es la producción de compuestos fluorescentes, de ahí su nombre (Álvarez et al, 2020: p.2).

La bacteria *Pseudomonas fluorescens* utiliza el proceso aeróbico como el más común, este consiste en la oxidación del anillo de benceno por la dioxigenasa para formar dihidrodioles, que luego pueden ser metabolizados vía catecoles y se oxidan a dihidroxilados, para después se convertirse en CO_2 y agua (Muñoz, 2016, pp. 2-3).

2.2 Legislación Ambiental

La investigación toma como antecedentes al Acuerdo Ministerial 097-A, anexo 2, libro VI del texto unificado de legislación secundaria del ministerio del ambiente; criterios de remediación de suelo como normativa ambiental vigente:

2.2.1 Acuerdo Ministerial 097-A

EL LIBRO VI ANEXO 2 (2015)

Contempla los requisitos de normas de aplicación, perspectivas de calidad del suelo y criterios de remediación. Los responsables de la contaminación al suelo producidos por: derramamientos, fugas, acopio, etc. Tendrá que proceder a la recuperación del sitio afectado, analizando los efectos y criterios de remediación de suelos contaminados, que dispone en la norma, además de un seguimiento de acciones de remediación hasta lograr los valores establecidos (MAE, 2015, p.32).

En cuanto a los criterios de calidad de suelo y perspectivas de remediación se dispone de acuerdo al manejo del suelo (comercial, residencial, agrícola, e industrial), que comprende un propósito de evaluar los niveles máximos de contaminantes de los diferentes tipos de suelo en proceso de restauración (MAE, 2015, p.33).

Tabla 2-2: Criterios de remediación (valores máximos permisibles)

Valores máximos permisibles para suelos					
Parámetro	Unidades	Uso del suelo			
		Residencial	Comercial	Industrial	Agrícola
Conductividad	us/mm	200	400	400	200
PH		6 a 8	6 a 8	6 a 8	6 a 8
TPH	mg/kg	230	620	620	150

Fuente: Hernández, 2013

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

CAPITULO III

3 MARCO METODOLÓGICO

El presente Trabajo de Integración Curricular se desarrolló en dos fases: campo y laboratorio, la fase de campo para las muestras de suelo y la fase de laboratorio para los análisis físico-químicos y microbiológicos, los cuales se llevaron a cabo en el Laboratorio Ambiental LABSU, ubicado en la provincia de Orellana “El Coca”, ciudad Francisco de Orellana, Parroquia Puerto Francisco de Orellana.

3.1 Fase de campo

3.1.1 Muestreo de suelo para los análisis físico-químicos

La metodología empleada para el muestreo fue la técnica de tresbolillo, que a continuación se describe:

Ubicación del muestreo de suelo

Ubicación: Orellana “El Coca”

Provincia: Francisco de Orellana

Temperatura: 20 °C – 34 °C



Ilustración 3-1: Ubicación de desarrollo del Trabajo de Integración Curricular
Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

Materiales:

- Pala
- Rastrillo
- Botas de caucho
- Funda grande
- Tarrinas plásticas
- Guantes
- Carretilla

Equipos:

- Balanza digital Acculab-V1200

Procedimiento de muestreo de suelo para los análisis físico-químicos:

En el sitio designado se identificó un total de 5 puntos de muestreo que se tomaron de la parte externa del LABSU, para lo cual se utilizó la técnica tresbolillo realizando un hueco de 15cm largo x 15cm ancho x 25cm de profundidad y recolectando 12kg de suelo, posteriormente se realizó la homogenización del suelo luego se transportó a un área de almacenamiento de muestra designada por la gerente del Laboratorio Ambiental LABSU para el respectivo tratamiento.

3.2 Fase de Laboratorio

Los análisis físicos químicos se realizaron en el laboratorio LABSU, donde para realizar estos parámetros toman como referencia el manual "STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER".

Tabla 3-1: Métodos de referencia para la caracterización del suelo

Parámetros	Técnica	Método de ensayo	Procedimiento de LABSU
pH (Potencial Hidrogeno)	Electrometría	EPA Método 9045 D Standard Methods 4500-H ⁺ B	PEE-LABSU-12
CE (Conductividad eléctrica)	Electrometría	Method 9050A EPA Standard Methods 2510 B	PEE-LABSU-13
TPH (Hidrocarburos Totales de Petróleo)	Espectrofotometría de infrarrojos	ASTM D3976-92 2001 EPA418.1, 1978	PEE-LABSU-04

<i>Pseudomona fluorescens</i>	Recuento de microorganismos	Standard Methods 9216A Direct Total Microbial Count EPA-600/8 Microbiological methods for monitoring the environment	PEE-LABSU-82
-------------------------------	-----------------------------	---	--------------

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

3.2.1 *Determinación de parámetros físico-químico del suelo en ausencia de hidrocarburos*

a) **pH del suelo**

La metodología empleada para determinar el pH fue tomada del procedimiento PEE-LABSU-12, la cual se describe a continuación:

Materiales:

- Vasos de plástico de 3oz
- Embudos de filtración simple
- Papel filtro cuantitativo
- Varilla de vidrio

Equipos:

- pH-Meter Δ Apera pH280
- Balanza analítica Acculab V-1200

Reactivos:

- Soluciones buffer de pH 4,01 / 7,00 / 10,00
- Material de referencia certificado de pH 4,00 / 7,00 / 10,00
- Agua destilada
- Agua grado HPLC

Procedimiento para determinar el pH del suelo:

Se procede a pesar 20g de suelo en un vaso de plástico de 3oz y se añadió 40mL de agua destilada, luego se agita la suspensión utilizando una varilla de vidrio, hasta homogenizar completamente,

después dejar en reposo la suspensión por una hora para filtrar la muestra. Finalmente sumergir el electrodo en la fase acuosa, remover suavemente para proporcionar homogeneidad y esperar unos minutos hasta que la lectura se estabilice (Rice et al., 2012: pp. 2-56)

b) Conductividad Eléctrica (CE) del suelo

La técnica o metodología empleada para la determinación de la CE fue tomada del procedimiento PEE-LABSU-13, la cual se describe a continuación:

Materiales:

- Vasos de plástico de 7oz
- Embudos de filtración simple
- Papel filtro cuantitativo
- Varilla de vidrio
- Agitador magnético

Equipos:

- Conductímetro HACH Ec71
- Balanza analítica Acculab V-1200

Reactivos:

- Estándar de calibración (147 $\mu\text{S}/\text{cm}$) (1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$) (12,88 mS/cm)
- Estándar de verificación (147 $\mu\text{S}/\text{cm}$) (1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$) (12,88 mS/cm)
- Agua destilada
- Agua grado HPLC

Procedimiento para determinar la CE del suelo:

Se procedió a pesar 20g de suelo en un vaso de plástico de 7oz y se añadió 60mL de agua destilada, luego se agita la suspensión utilizando una varilla de vidrio, hasta homogenizar completamente, se deja en reposo la suspensión por una hora para filtrar la muestra. Finalmente se sumerge la sonda en la muestra y se coloca el agitador magnético de manera que se agite el medio, esperar unos minutos hasta que la lectura se estabilice (Rice et al., 2012, pp: 2-56)

c) TPH del suelo

La metodología empleada para la realización de TPH fue tomada del procedimiento PEE-LABSU-04, la cual se describe a continuación:

Materiales:

- Celdas de cuarzo con tapa TFE
- Embudos simples
- Pipetas volumétricas de 0,5/1/2/5/10mL
- Tubos de ensayos tapa rosca
- Pinzas de crisol y de tubos
- Espátula de acero inoxidable
- Papel filtro
- Aluminio

Equipos:

- Espectrofotómetro IR Spectrum Two PerkinElmer
- Estufa Secador Eijkelkamp BE20
- Ultrasonido BRANSON 5210
- Balanza analítica Sartorius

Reactivos:

- Solvente: Polímero extractante Horiba S-316
- Agua libre de compuestos orgánicos: Filtrar agua destilada a través de 10g de carbón activo
- Sulfato de sodio anhidro desecado
- Sílice gel 60-200 mesh: Grado 950 o equivalente, secado 110°C por 24 horas

Procedimiento para determinación de TPH del suelo:

Para medir la concentración de TPH en el suelo primero se pesó un gramo de muestra en un tubo de ensayo, luego se añadió aproximadamente 0,50g de sulfato de sodio anhidro y 0,3g sílice gel, se agregó 10mL del polímero extractante Horiba y se agitó hasta que se forme una suspensión homogénea y se llevó al ultrasonido por 15 minutos. Después se procedió a filtrar la capa del

solvente a través de un embudo con papel filtro, por último, se recogió el extracto en un balón aforado de 10mL y entonces el extracto está listo para ser medido en el equipo. Los resultados de TPH se reporta en base seca, para lo cual se pesó 5g aproximadamente de muestra dentro de un envase de aluminio previamente tarada y se colocó en la estufa a 105°C por 24 horas, se dejó enfriar en el desecador antes de pesarla, después se procedió a pesar el residuo seco contenido en el envase de aluminio y finalmente se registró la diferencia de pesos (Rice et al., 2012: pp. 4-94).

3.2.2 Esterilización del suelo

La metodología empleada para la esterilización del suelo fue por calor seco por el método de aire caliente, que se describe a continuación:

Materiales:

- Bandejas metálicas

Equipos:

- Estufa memmert

Procedimiento para la esterilización del suelo:

Se procedió a colocar 1kg de suelo por cada bandeja de metal a 170°C durante 2 horas, esto se realizó con los 12kg de suelo, luego se esperó que el suelo se enfríe.

3.2.3 Contaminación del suelo con hidrocarburos

La metodología que se utilizó fue la contaminación puntual que se describe a continuación.

Materiales:

- Probeta 100ml
- Vaso precipitado
- Crudo a 27 API

Procedimiento para la contaminación del suelo con hidrocarburo:

Se contaminó los 12kg de suelo estéril a una concentración de 40000 ppm de la siguiente manera: agregamos 480mL de hidrocarburo de 27 grados API con la probeta de 100mL, luego se homogenizó el suelo y se estabilizó en el transcurso de 15 días y durante este tiempo se realizó mediciones de TPH cada 5 días para saber cuánto se volatilizó el crudo.

3.2.4 *Determinación de los parámetros físico-químico del suelo contaminado con hidrocarburos*

Se realizó el análisis de los parámetros físicos-químicos como son pH, conductividad eléctrica y los TPH, para lo cual se utilizó la metodología anteriormente descrita en el punto 2.5.2.1.

3.2.5 *Aplicación de la técnica de Landfarming utilizando Pseudomona fluorescens para degradar TPH*

a) Diseño experimental

Se utilizó un diseño factorial de dos factores, con medidas repetidas en un factor.

El factor tratamiento es la concentración de la bacteria *Pseudomona fluorescens* y tiene 4 niveles que son:

T0: Testigo (sin *Pseudomona fluorescens*)

T1: *Pseudomona fluorescens* (concentración 1×10^{-1})

T2: *Pseudomona fluorescens* (concentración 1×10^{-2})

T3: *Pseudomona fluorescens* (concentración 1×10^{-3})

El factor con medidas repetidas es el tiempo y tiene cuatro niveles que son:

Tiempo 1: 15 días

Tiempo 2: 30 días

Tiempo 3: 45 días

Tiempo 4: 60 días

Cada tratamiento se asignó de manera aleatoria a tres unidades experimentales. Las variables de respuesta fueron: pH, conductividad y concentración de TPH. La disposición del diseño factorial es el siguiente:

Tabla 3-2: Disposición del diseño factorial

Tratamiento	Tiempo			
	15 días	30 días	45 días	60 días
T0	R1	R1	R1	R1
	R2	R2	R2	R2
	R3	R3	R3	R3
T1	R1	R1	R1	R1
	R2	R2	R2	R2
	R3	R3	R3	R3
T2	R1	R1	R1	R1
	R2	R2	R2	R2
	R3	R3	R3	R3
T3	R1	R1	R1	R1
	R2	R2	R2	R2
	R3	R3	R3	R3

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

b) Activación de la bacteria *Pseudomona fluorescens*

La cepa que se utilizó para esta investigación fue la *Pseudomona fluorescens* ATCC 13525 de la distribuidora MEDIBAC que es una empresa dedicada a la comercialización de insumos para laboratorio ubicada en Quito.

La metodología empleada para la activación de la bacteria *Pseudomona fluorescens* fue por el método Strain P-17, Spirillum Strain NOX Method, que se describe a continuación:

Materiales:

- Buffer fosfato
- Vaso estéril

Equipos:

- Estufa Rebelk RI50
- Cámara de flujo laminar Biobase BBS-V680

Procedimiento para la activación de la bacteria *Pseudomona fluorescens*:

Considerando las recomendaciones del certificado de la cepa de referencia para la activación de la bacteria, primero se colocó dentro de la cámara de flujo laminar el fluido hidratante (buffer fosfato) y el vial de pellets que se encontraban en refrigeración, luego se colocó en el mesón para

transferir 100mL de buffer fosfato a un frasco estéril, después se dejó reposar por una hora a temperatura ambiente hasta que se estabilice la solución. Transcurrido el tiempo se colocó el buffer fosfato en la estufa de 34 a 38 °C por 30 minutos, seguidamente se sacó el buffer fosfato de la incubadora y se colocó en el mesón de la cámara de flujo laminar, posteriormente con una pinza estéril se tomó un pellet de la cepa de referencia (*Pseudomona fluorescens* ATCC 13525) y se colocó en los 100mL de buffer fosfato del paso anterior, de inmediato se cerró el frasco estéril para colocarlo en refrigeración, después se colocó el frasco estéril que contiene los 100mL de buffer fosfato más el pellet de 34 a 38 °C en incubación por 15 minutos para asegurar la hidratación completa, concluido el tiempo se sacó el frasco estéril de la incubadora y se agitó la mezcla para obtener una suspensión de *Pseudomona fluorescens* (Keith, 1996, pp.9-62).

c) Preparación de la *Pseudomona fluorescens* en diluciones seriadas

La metodología empleada para las diluciones seriadas de la bacteria *Pseudomona fluorescens* fue el método Strain P-17, Spirillum Strain NOX Method, que se describe a continuación:

Materiales:

- Tubos de ensayo
- Buffer fosfato
- Pipetas
- Gradilla

Equipos:

- Cámara de flujo laminar Biobase BBS-V680

Procedimiento para las diluciones seriadas de *Pseudomona fluorescens*:

Previo a realizar las diluciones seriadas, se esterilizó todos los materiales a utilizar en la cabina de flujo laminar (pipeta, tubos de ensayo con buffer fosfato, puntas de pipeta), luego se preparó diluciones sucesivas con la ayuda de una micropipeta se tomó 1ml de suspensión de *Pseudomona fluorescens* y se transfirió a un tubo de ensayo que contiene 9mL de buffer fosfato y se agitó para obtener la dilución 1×10^{-1} , de esta dilución se tomó 1mL y se transfirió a un tubo que contiene 9mL de buffer fosfato para obtener la dilución 1×10^{-2} , para finalizar se transfirió 1mL a un tubo que contiene 9mL de buffer fosfato para obtener la dilución 1×10^{-3} (Keith, 1996, pp.9-62).

d) Preparación de los tratamientos

Distribución de las cajas

Se adquirió 12 cajas plásticas de 21cm de largo por 11,5 de ancho y 8,5 de profundidad.

Materiales:

- Envase estéril
- Guantes

Equipos:

- Balanza Acculab-V1200

Procedimiento para la distribución de los tratamientos:

Se pesó un kilogramo para cada una de las cajas en total para el tratamiento se utilizó 12 cajas tres por cada dilución de *Pseudomona fluorescens*.

e) Inoculación de *Pseudomona fluorescens* en el suelo contaminado con hidrocarburo

Materiales:

- Atomizador
- Cajas plásticas con los suelos contaminados

Procedimiento para la aplicación de la bacteria *Pseudomona fluorescens* en el suelo contaminado con hidrocarburo:

En un atomizador se añadió 10mL de cada una de las diluciones y se roció en el suelo contaminado con hidrocarburos según el diseño experimental.

f) Oxigenación del suelo

Se procedió a realizar la aireación del suelo todos los días a cada una de las muestras, con la finalidad de ayudar a la bacteria *Pseudomona fluorescens* a estimular la circulación de soluciones a través del suelo contaminado.

g) Cuantificación de *Pseudomona fluorescens* al inicio y al final del tratamiento

Para la cuantificación de la *Pseudomona fluorescens* se utilizó los métodos Standard Methods 9216A Direct Total Microbial Count y EPA-600/8 Microbiological methods for monitoring the environment que se describe a continuación:

Materiales:

- Agua destilada
- Pipetas
- Espátula
- Suelo contaminado
- Dispensor
- Cajas Petri
- Guantes
- Mascarillas
- Cofia
- Bata
- Zapatones

Equipos:

- Rota vapor Buchi
- Autoclave mrc
- Balanza OHAUS
- Cámara de flujo laminar Biobase BBS-V680
- Estufa Rebelk

Reactivos:

- Agar Cetrimida

Procedimiento para la cuantificación de *Pseudomona fluorescens*:

Se preparó el medio de cultivo Agar cetrimida (AQLAB) en función de las etiquetas de la casa productora Difco.

Se pesó 20g de agar cetrimida y se agregó 0,44L de agua destilada y se colocó en el rota vapor por 10 minutos hasta que el agar se disuelva totalmente en el agua destilada, luego se llevó la disolución a la autoclave por 20 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo se sacó la disolución y se dejó que baje la temperatura.

Para la cuantificación de *Pseudomona fluorescens* en los 12 tratamientos se procedió a pesar 10g de suelo de cada caja plástica y se colocó en diferentes envases estériles, luego se agregó 90mL de buffer fosfato en cada envase estéril.

Después se vertió aproximadamente 30mL de medio de cultivo cetrimida en las 12 cajas Petri y se deja reposar 20 minutos hasta que se gelifique, luego se tomó 100uL de la solución buffer fosfato con suelo y esparcimos con el dispersor y se dejó reposar 2 días a una temperatura de 30 °C. Transcurrido los 2 días se procede a observar el crecimiento de los microorganismos en las cajas Petri y se realizó la cuantificación del crecimiento de la bacteria *Pseudomona fluorescens* (Keith, 1996, pp.9-62).

Determinación de la cantidad de microorganismos por mililitro de la muestra, mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Promedio de colonias contadas} \times \text{Recíproco de la dilución}}{\text{Volumen incluido en caja}} = \text{UFC/mL}$$

Fuente: Ramírez, 2015

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

3.2.6 Monitoreo de los tratamientos

a) Análisis de parámetros físico-químicos

Cada 15 días en el transcurso de dos meses se realizó los análisis de los parámetros físicos como son: pH, conductividad eléctrica y los químicos como son los TPH, para lo cual se utilizó la metodología anteriormente descrita en el punto 3.2.1.

3.2.7 Análisis de varianza ANOVA de dos factores

En esta investigación se evaluó el efecto de la concentración de la bacteria *Pseudomona fluorescens* y del tiempo sobre la concentración de TPH, para lo cual se utilizó un diseño factorial de dos factores, con medidas repetidas en un factor ya que se realizaron varias mediciones sobre las mismas unidades experimentales en distintos periodos de tiempo.

El factor tratamiento o concentración de *Pseudomonas* tiene cuatro niveles: T0 (Testigo), T1 (1×10^{-1}), T2 (1×10^{-2}) y T3 (1×10^{-3}). El factor con medidas repetidas es el tiempo y tiene cuatro niveles: 15, 30, 45 y 60 días.

Cada concentración de *Pseudomona fluorescens* se asignó aleatoriamente a tres unidades experimentales (bandejas con suelos contaminado con hidrocarburos), y en cada unidad experimental se midió la concentración de TPH a los 15, 30, 45 y 60 días. El análisis de varianza se realizó con el programa estadístico IBM SPSS (Statistics) versión 26 a un nivel de confianza del 95% (nivel de significancia de 0,05). Las hipótesis del análisis de varianza para cada factor y la interacción son:

H0: Todas las medias de los niveles del factor tratamiento son iguales.

H1: Al menos alguna media de un nivel del factor tratamiento es diferente de las demás.

H0: Todas las medias de los niveles del factor tiempo son iguales.

H1: Al menos alguna media de un nivel del factor tiempo es diferente de las demás.

H0: No existe interacción entre los factores tratamiento y tiempo.

H1: Existe interacción entre los factores tratamiento y tiempo.

CAPITULO IV

4 ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Determinación de los parámetros físico – químicos del suelo en ausencia y presencia de hidrocarburos totales de petróleo.

Tabla 4-1: Comparación de los resultados del suelo en ausencia de hidrocarburos con el Acuerdo Ministerial 097-A.

Parámetros	Unidades	Uso de suelo Industrial	Suelo en ausencia de hidrocarburos
Conductividad	ds/mm	200	12,45
PH		6 a 8	7,76
TPH	mg/kg	620	<0,50

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

Los resultados del suelo en ausencia de hidrocarburos para conductividad, pH y TPH fueron: 12,45 ds/mm, 7,76 y <0,50 respectivamente, estos tres valores obtenidos se encuentran dentro del rango de valores máximos permisibles según el Acuerdo Ministerial 097-A, Criterios de remediación (tabla 2-3).

Tabla 4-2: Comparación de los resultados del suelo en presencia de hidrocarburos con el Acuerdo Ministerial 097-A.

Parámetros	Unidades	Uso de suelo Industrial	Suelo en presencia de hidrocarburos
Conductividad	ds/mm	200	67,0
PH		6 a 8	5,65
TPH	mg/kg	620	34792,82

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

Una vez contaminado el suelo con hidrocarburos en el laboratorio LABSU se procedió a medir los parámetros físico-químicos obteniéndose los siguientes resultados: conductividad 67,0 ds/mm, este valor de conductividad se encuentra dentro del rango de valores máximos permisibles según el Acuerdo Ministerial 097-A, Criterios de remediación (tabla 2-3). Sin embargo, los valores de TPH 34792,82 mg/kg y pH 5,65; se encuentra fuera del rango del valor máximo permisible que es 620 mg/kg, como se observa en la tabla 4-2.

4.2 Resultado de los parámetros fisicoquímicos medidos en los diferentes tratamientos en intervalos de 15, 30, 45 y 60 días.

Conductividad

Tabla 4-3: Análisis de la conductividad eléctrica

	Límites máximos permisibles	15 días	30 días	45 días	60 días
T0	200 ds/mm	58,77	59	58,3	56,4
T1		56,7	60,6	60,5	59,4
T2		64,8	70,6	66,8	65,3
T3		61,9	70	63,8	66,2

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

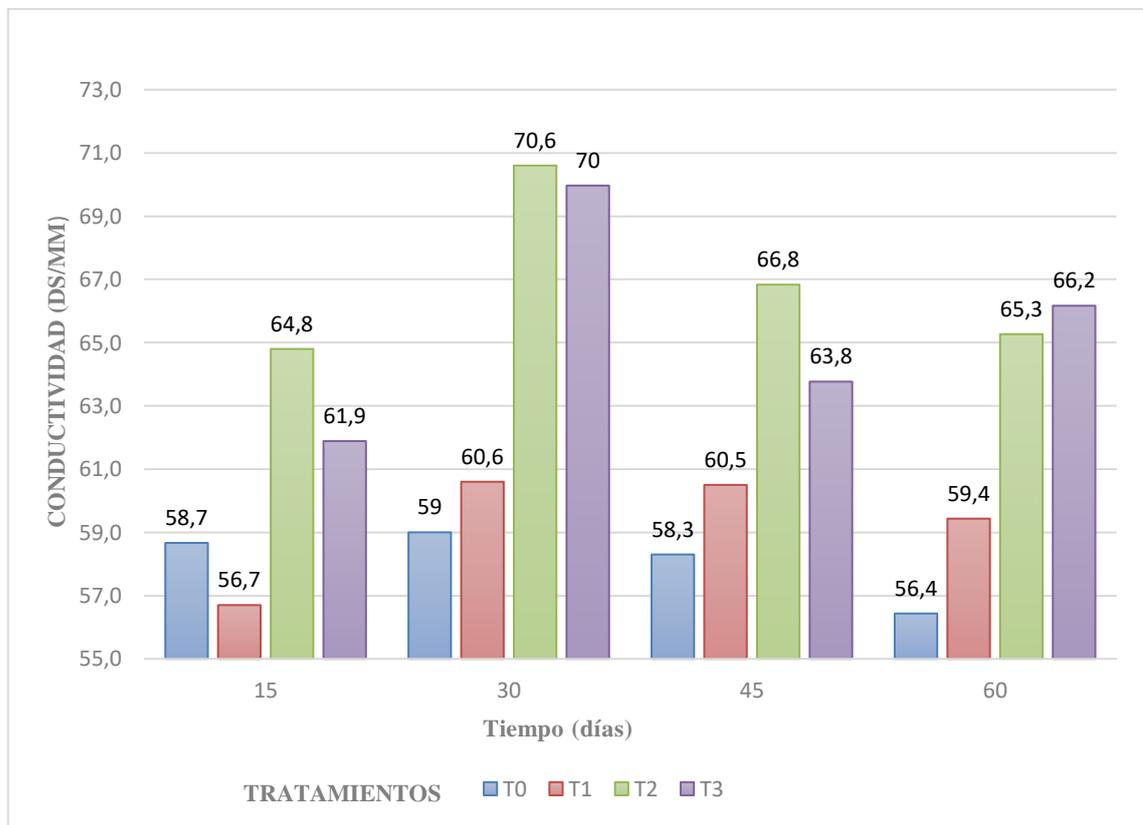


Ilustración 4-1: Conductividad medido en diferentes intervalos de tiempo.

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

Los resultados de la conductividad eléctrica del suelo de los diferentes tratamientos T1, T2, T3 y T0 estuvo en un rango entre 56,4 a 70,6 ds/mm. Estos valores nos indican que se encuentran dentro el rango según en la tabla 2-3 del Acuerdo Ministerial 097-A, su valor máximo permisible es de 200ds/mm. En la ilustración 4-1, podemos apreciar que el valor más alto de conductividad

eléctrica a los 60 días fue del tratamiento T3 con 66,2 ds/mm y el valor más bajo fue del T1 con un valor de 59,4. Ante estos valores, (Muñoz, 2016, p.48) menciona que la presencia de hidrocarburos en el suelo aumenta la C.E y al mismo tiempo estimula el metabolismo de las poblaciones microbianas, provocando que los hidrocarburos no imposibiliten la solubilización de las sales e iones existentes en el suelo, por eso sus valores varían cada cierto tiempo. Tal es el caso del estudio experimental realizado por (Puente, 2022, p.68) que también presentó la misma tendencia respecto al incremento de los valores, debiéndose a que un crudo no refinado posee cierto nivel sales y esto permite un ligero intercambio catiónico.

pH

Tabla 4-4: Análisis del pH

	Límites máximos permisibles	15 días	30 días	45 días	60 días
T0	6 - 8	6,02	6,06	6,06	6,07
T1		6,08	6,19	6,32	6,25
T2		6,08	6,36	6,54	6,27
T3		6,13	6,30	6,20	6,03

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

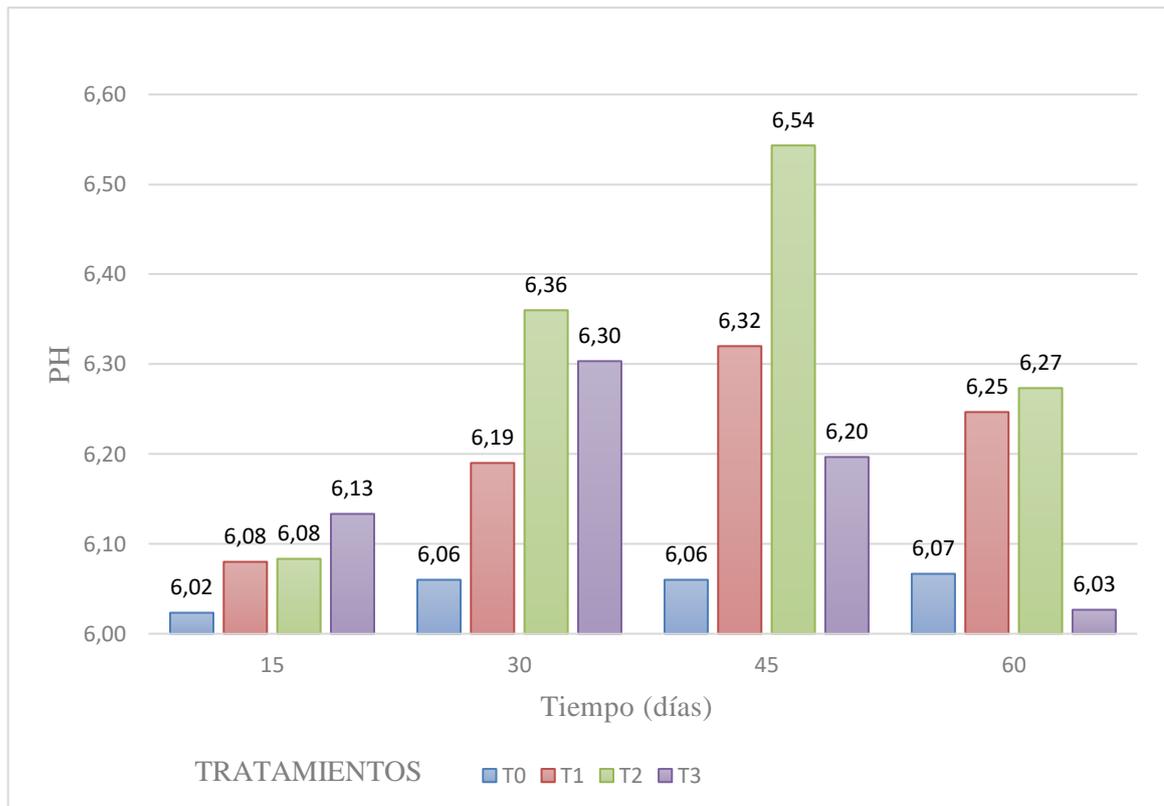


Ilustración 4-2: pH medido en diferentes intervalos de tiempo.

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

En la tabla 2-3 del Acuerdo Ministerial 097-A, señala que los límites máximos permisibles para el pH en suelo son de 6 a 8, según (Muñoz, 2016, p. 46) el pH óptimo para la degradación de hidrocarburos con *Pseudomonas fluorescens* es de 6-8 y los resultados obtenidos en las diferentes concentraciones T0, T1, T2 y T3 a los 15, 30, 45 y 60 días se observó que el pH se mantiene entre 6,02 y 6,54. La poca variación de pH que ocurre en el transcurso de los 15,30,45 y 60 días, (Puente & Campoverde, 2022, p.65) menciona que se debe a la liberación de los compuestos del hidrocarburo en el suelo, cambiando sus propiedades permitiendo que la bacteria *Pseudomona fluorescens* empiece a degradar. El pH más alto en estos dos meses fue el T2 con 6,27 y el valor más bajo fue T3 con 6,03 como se muestra en la ilustración 4-2.

En nuestra investigación *Pseudomona fluorescens* degradó los hidrocarburos de manera rápida ya que su pH estaba dentro de las condiciones óptimas acelerando el proceso de biorremediación, concordando con lo que indica (Rodríguez et al.,2022: p. 196) que el proceso de biorremediación debe desarrollarse en un pH entre 6 - 8, si se pretende que se mantengan largos períodos de biodegradación el pH óptimo es de 7.4 - 7.8 este rango determina el grado de absorción de iones por las partículas del suelo, afectando su solubilidad, movilidad y disponibilidad, siendo estos factores determinantes para el proceso de biorremediación. Así, frente a pH extremos (>8 o <4), la biodegradación es muy lenta y los estudios muestran que los suelos contaminados por

hidrocarburos son principalmente ácidos, por cuanto se limita el crecimiento de ciertas bacterias en ciertos rangos. Otro estudio realizado por (Arrieta, 2011, p.74), dice que la actividad biológica del suelo puede ser afectada por el pH, debido a que el rango óptimo es de 6 a 8. Por lo tanto, (Meneses, 2014, p.34) reporta que la biorremediación con géneros de *Pseudomona* se ve favorecida con valores de pH casi neutros (6-8) mejorando el proceso de biodegradación en general.

TPH

Tabla 4-5:Valores del análisis de TPH

	Límites máximos permisibles	15 días	30 días	45 días	60 días
T0	620 mg/kg	31607	28430	26732	24534
T1		19305	10482	3768	607
T2		20374	14606	5536	1029
T3		21715	15310	6576	5418

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

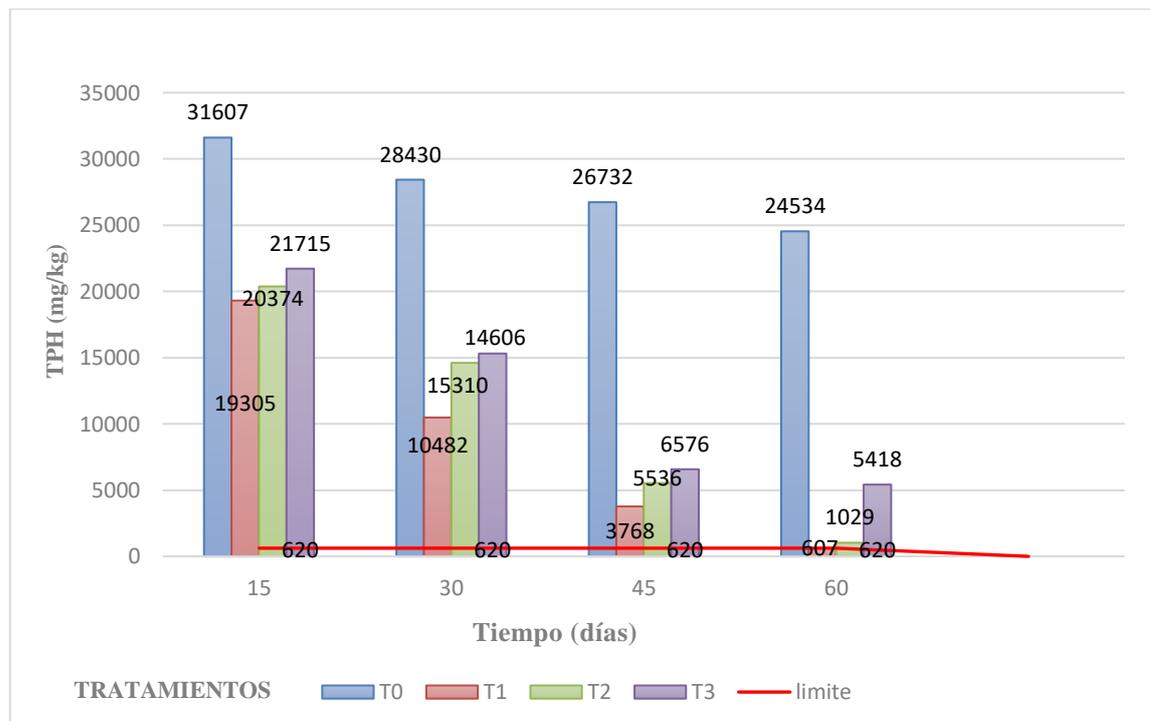


Ilustración 4-3: TPH medido en diferentes intervalos de tiempo.

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

Según la ilustración 4-3 se puede observar que la concentración de TPH en el suelo disminuye en los diferentes intervalos de tiempo (15, 30, 45 y 60 días). La concentración más baja de TPH se obtuvo con el T1 con un valor 607mg/kg y la concentración más alta fue con el T3 con un valor de 5418 mg/kg a los 60 días. Según (Muñoz, 2016, p. 42) menciona que el género *Pseudomona* tiene la capacidad de producir sustancias biosurfactantes: compuestos que se encargan de solubilizar y facilitan la penetración de los hidrocarburos por la pared celular hidrófila. Además, poseen enzimas que degradan hidrocarburos en la membrana citoplasmática, produciendo ciertos ácidos orgánicos implicados en la solubilización del fosfato.

En otro estudio similar (Jimenez, 2020, p. 71) menciona que *Pseudomona fluorescens* tiene la capacidad de degradar distintos compuestos de hidrocarburos presentes en el suelo por lo que, puede ser utilizado en campos de investigación experimental para la remediación de suelos contaminado con crudo. En un estudio experimental de (Riera, 2012, pp.70-71) indica que en los suelos afectados por hidrocarburos predominan bacterias Gram negativas. Por lo tanto, las bacterias Gram negativas demuestran ser predominantes en tolerar y degradar compuestos de hidrocarburos.

Cuantificación de la bacteria *Pseudomona fluorescens* Colocar antes de los TPH después de pH y conductividad

Tabla 4-6:Cuantificación de *Pseudomona*

Tratamiento	Tiempo	
	Día 1 (inicio) UFC	Día 60 (final) UFC
T0	0	0
T1 (1x10 ⁻¹)	4467	2300
T2 (1x10 ⁻²)	2133	1033
T3 (1x10 ⁻³)	133	0

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

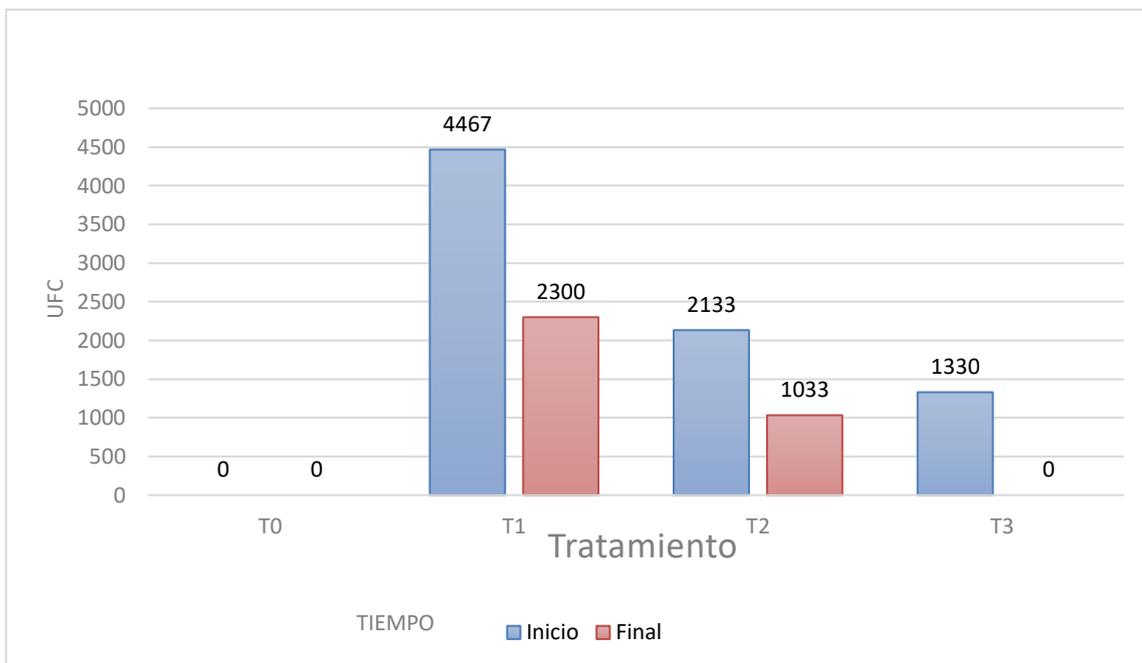


Ilustración 4-4: Cuantificación al inicio y al final.

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

Se realizó un conteo para tener un registro del aumento o disminución de la población de *Pseudomona fluorescens* al inicio y al final del ensayo experimental. En nuestro estudio como se muestra en la ilustración 4-4 que, en todos los tratamientos, el comportamiento de *Pseudomona fluorescens* se encontraba en su fase estacionaria y es aquí donde al disminuir los nutrientes esenciales y por factores como la temperatura y la humedad, las bacterias dejaron de metabolizar y por ende empezaron a disminuir.

4.3 Determinación de la eficiencia de la bacteria *Pseudomona fluorescens* para biodegradar los Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH).

Resultados estadísticos del ANOVA de dos factores con medidas repetidas en un factor

Los resultados del ANOVA del diseño se presentan a continuación:

Tabla 4-7: ANOVA del factor tratamiento

Pruebas de efectos inter-sujetos					
Medida: TPH					
Variable transformada: Promedio					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Valor p
Intersección	10445513846,2	1	10445513846,27	139807,46	,000
Tratamiento	2817628419,39	3	939209473,13	12570,80	,000

Error	597708,53	8	74713,57		
-------	-----------	---	----------	--	--

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

En la tabla 4-7 se observa que para el factor tratamiento, el valor $p < 0,05$, por lo que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y se concluye que la concentración de TPH no es la misma para todas las concentraciones de la bacteria *Pseudomona fluorescens*.

Tabla 4-8: ANOVA del factor tiempo

Pruebas de efectos intra-sujetos					
Medida: TPH					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Valor p
Tiempo	1704440623,49	3	568146874,50	7418,59	,000
Tiempo * Tratamiento	211083420,44	9	23453713,38	306,25	,000
Error (Tiempo)	1838022,12	24	76584,26		

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

En la tabla 4-8 se observa que para el factor tiempo, el valor $p < 0,05$, por lo que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y se concluye que la concentración de TPH no es la misma para todos periodos de tiempo.

Para la interacción tiempo-tratamiento, el valor $p < 0,05$, por lo que se rechaza concluye que existe interacción entre ambos factores, por lo tanto, su interpretación tiene prioridad sobre la interpretación de los efectos de los factores principales y la información relevante del diseño se obtiene del gráfico de interacción.

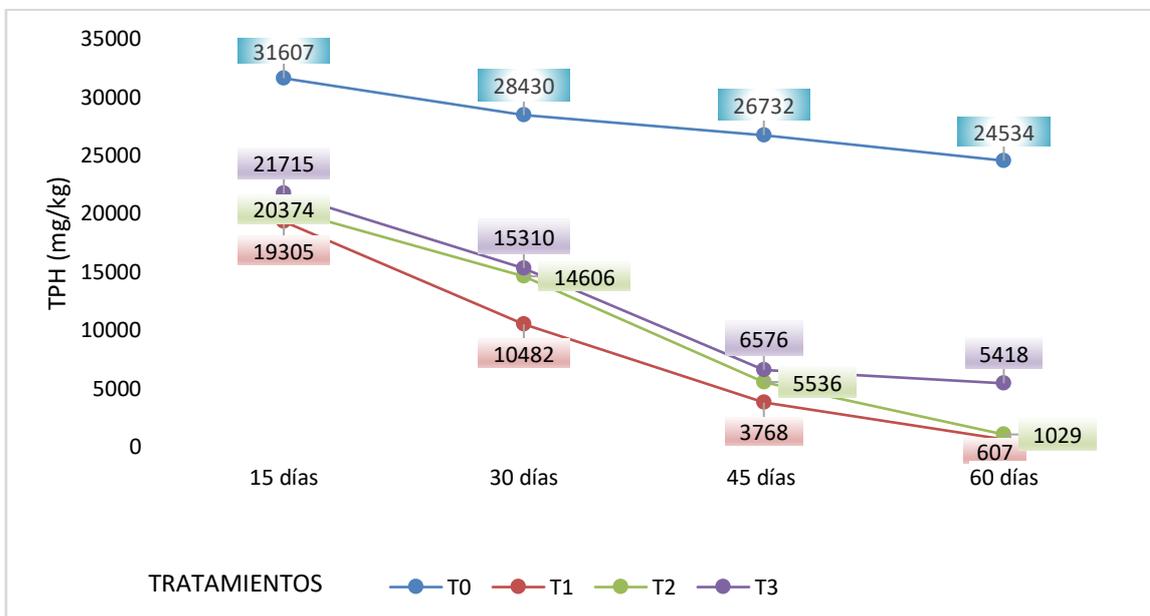


Ilustración 4-5: Eficiencia de *Pseudomona fluorescens* en cuatro tiempos.

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

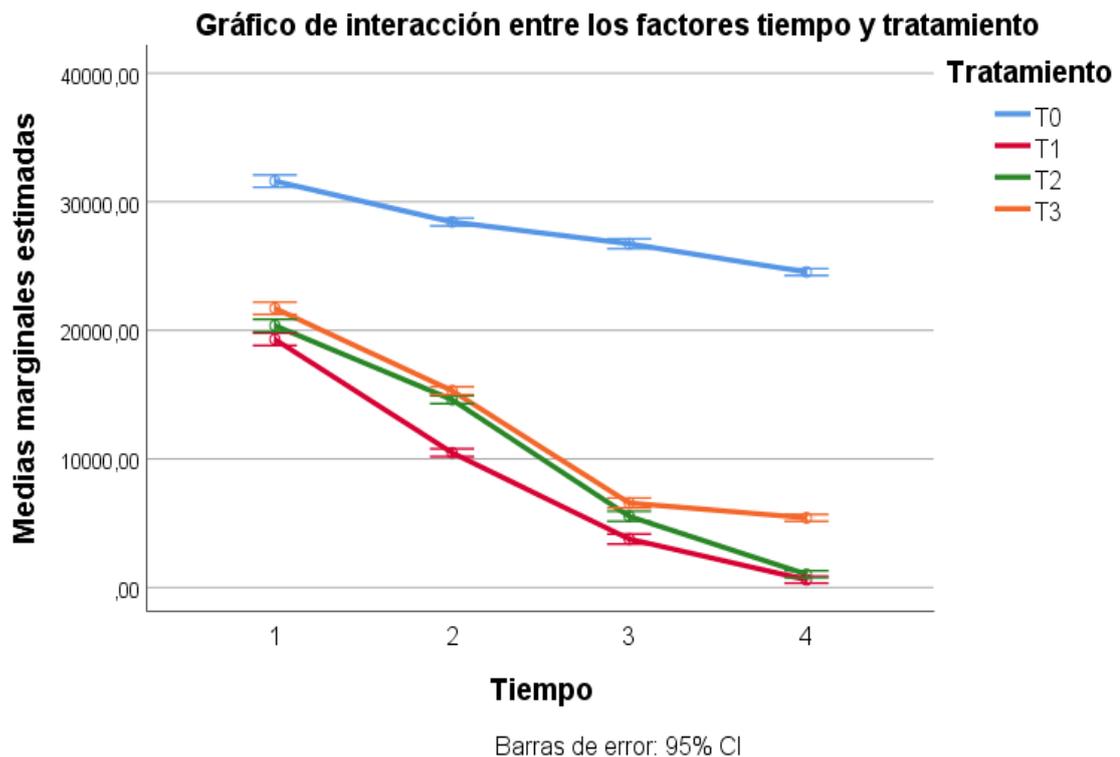


Ilustración 4-6: Eficiencia de *Pseudomona fluorescens* en cuatro tiempos.

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

En la ilustración 4-6 se observa que, en todos los periodos de tiempo, la menor concentración de TPH se obtiene con el T1, sin embargo, a los 15 días su intervalo de confianza se solapa con el intervalo de confianza del T2, lo que indica que no son diferentes estadísticamente. El solapamiento de los intervalos no ocurre a los 30 y 45 días, por lo que, en estos periodos de tiempo, existe evidencia estadística suficiente para concluir que la menor concentración de TPH se obtiene con el tratamiento T1. Finalmente, a los 60 días también existe un solapamiento de los intervalos de los T1 y T2, por lo tanto, se concluye que la menor concentración de TPH se obtiene con los tratamientos T1 y T2, pero el tratamiento T1 es el único que llega a encajar dentro de los límites máximos permisible del uso de suelo industrial del Acuerdo Ministerial 097-A, de la tabla de criterio de calidad del suelo.

Para validar los resultados del diseño se probaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. La normalidad se probó con los residuos del modelo y la prueba de Shapiro Wilk debido a que se disponen de 12 datos para cada periodo de tiempo. Finalmente, la homogeneidad de varianzas se probó con la prueba de Levene. En ambos casos, se cumplieron los supuestos.

Tabla 4-9: Porcentaje de la degradación de la bacteria

Porcentaje de degradación de la bacteria <i>Pseudomona fluorescens</i>				
Tratamiento	Tiempo			
	15 días	30 días	45 días	60 días
T3	37,58%	55,99%	23,08%	84,42%
T2	41,44%	58,02%	84,08%	97,04%
T1	44,51%	69,87%	89,17%	98,25%

Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

En la tabla 4-9 se observa como la bacteria *Pseudomona fluorescens* degrada de manera eficiente los TPH. En el T1 se obtuvo una eficiencia de 98,25 % para lo cual se puede comprobar su excelente eliminación de hidrocarburos, además de este valor encontrarse dentro el valor máximo permisible.

CAPITULO V

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se determinó los parámetros físico-químicos del suelo en ausencia y presencia de hidrocarburos. En presencia de hidrocarburos los valores obtenidos fueron pH=5,65, conductividad=67 ds/mm y TPH=34792,82 mg/kg. El valor de la conductividad se encuentra dentro del límite máximo permisible, mientras que los valores de pH y TPH, se encuentran fuera del rango del límite máximo permisible para uso industrial establecido en el Acuerdo Ministerial 097-A.

Se utilizó la técnica de *Landfarming* como método de biorremediación de muestras de suelos contaminados con hidrocarburos. La bacteria que se empleó fue *Pseudomona fluorescens* a diferentes concentraciones, cada concentración corresponde a un tratamiento diferente (T1= 1×10^{-1} , T2= 1×10^{-2} , T3= 1×10^{-3}). Esta técnica de landfarming se optimizó aireando el suelo diariamente con el fin de mejorar la degradación de los hidrocarburos por parte de la bacteria.

Se determinó la eficiencia de la *Pseudomona fluorescens* para biodegradar los Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH) mediante la medición de la concentración de TPH cada 15 días durante dos meses. En donde, el T1 con una concentración bacteriana de 1×10^{-1} fue el más eficiente a los 15, 30 y 45 días. Sin embargo, a los 60 días los tratamientos más eficientes fueron el T1 y T2 (1×10^{-2}). Esto indica que la bacteria fue capaz de utilizar los hidrocarburos totales de petróleo como fuente de carbono, ya que al inicio el suelo tenía una concentración de TPH de 34792,82 mg/kg y a los 60 días los valores fueron de 607 mg/kg para el tratamiento T1 y 1029mg/kg para el T2, cuyos valores son iguales estadísticamente.

Se realizó una cuantificación de la *Pseudomona fluorescens* al inicio y al final de los tratamientos, siendo los valores directamente proporcionales a la concentración de TPH. Es decir, que el mayor número de colonias se reportó al inicio del tratamiento y el menor número al final ya que al disminuir los nutrientes esenciales y por factores como la temperatura y la humedad, las bacterias dejaron de metabolizar y por ende empezaron a disminuir.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda que se usen otras técnicas de biorremediación para suelos como biopilas y se aplique *Pseudomona fluorescens* para acelerar la capacidad biodegradadora de los contaminantes orgánicos.

Duplicar el tiempo de degradación de los TPH de cada uno de los tratamientos para ver el comportamiento estadístico de los datos.

Utilizar consorcios bacterianos en suelos con altos índice de contaminación por derrame de crudo y derivados, para mejorar la rapidez de la actividad degradativa por parte de los microorganismos y reducir los TPH.

BIBLIOGRAFÍA

ÁLVAREZ, J. "Pseudomonas fluorescens: Mecanismos y aplicaciones en la agricultura sustentable". *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* [En línea], 2020, (México) 16 (1), pp. 1-10. [Consulta: 31 octubre 2022]. ISSN 2594-0384. Disponible en: <https://revista.itson.edu.mx/index.php/rlrn/article/view/286>

APUNTE CRUZ, Jonathan David; & LICANGO TUQUERRES, Jonathan Rafael. Evaluación del proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos totales de petróleo utilizando trichoderma sp. y bacillus pumilus, mediante el sistema de biopilas a escala de laboratorio auto [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad Politécnica Salesiana, Sede Quito, Ecuador. 2021. pp. 5-7. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/19882>

ARRIETA RAMÍREZ, Olga. Evaluación de la influencia del bioestímulo sobre un suelo contaminado con diesel y su integración a la gestión ambiental [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad Nacional de Colombia, Colombia. 2011. pp. 12-13. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/8287/32240957.2011.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

ATSDR. *Reseña toxicológica de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Resumen de salud pública. Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos* [En línea]. Springfield-Estados Unidos: National Technical Information Service (NTIS), 1995. [Consulta: 2016-05-06]. Disponible en: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.html

BANCO Central del Ecuador, *Reporte del Sector Petrolero* [En línea]. II Trimestre. Quito-Ecuador: Microsoft, 2021, [Consulta: 2022-08-22]. Disponible en: <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/Estadisticas/Hidrocarburos/ASP202102.pdf>.

BELTRÁN PINEDA, Mayra Eleonora. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad de Boyacá, Colombia. 2015. pp. 101-113. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v15n1/v15n1a09.pdf>.

BUENDÍA RIOS, Hildebrando. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante compost de aserrín y estiércoles [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. 2012. p. 15. Disponible en:

http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/2290/Buendía_rh.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

CASTILLO ROJAS, Paúl. Aplicación de la técnica de landfarming para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad de Pirhua, Perú. 2009. p. 89. Disponible en: https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/3113/ICI_171.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

ENRIQUEZ FERNANDEZ, Paulo Cesar. Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo a partir de diferentes muestras ambientales [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú. 2022. pp. 18-19. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12773/14764/UPenfepc.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

FIESTAS CASTRO, Cecilia Nora; & VÁSQUEZ VILLALOBOS, Walter Alexander. Biorremediación de suelos salinos contaminados con petróleo por el consorcio bacteriano de *Pseudomonas* por la técnica de bioaumentación [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad Cesar Vallejo, Perú. 2020. p. 7. Disponible en: http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/47102/Gutierrez_RS-SD.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

GARCÉS, M. "Community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with native plants". *MicrobiologyOpen* [En línea], 2018, (Ecuador) 8 (4), pp. 1-2. [Consulta: 2019-04-20]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/mbo3.703>.

GÓMEZ, Sara; et al. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia. 2021. pp. 76-84. Disponible en: <https://doi.org/10.22490/24629448.398>

GONZALES BELLIDO, Janet Francisca. Estudio De La Contaminación De Suelos Por Residuos De Hidrocarburos Y Propuesta De Manejo Ambiental De Los Talleres De Mecanica Automotriz Del Distrito De San Jerónimo-Cusco [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad San Agustín de Arequipa, Perú. 2018. pp. 1-188. Disponible en: <http://bibliotecas.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/6544/CFMgobejf.pdf?sequence=3&isAll>

owed=y.

GOYA CASTRO, Nelson Iván. Análisis De Las Estrategias Para La Biorremediación De Suelos Contaminados Con Hidrocarburos Totales De Petróleo (Tph) [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad de Guayaquil, Ecuador. 2015. p.136. Disponible en: [http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/51387/1/TFM_Nelson_Iván_Goya_Castro_15_10_10 %283%29.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/51387/1/TFM_Nelson_Iván_Goya_Castro_15_10_10%20%283%29.pdf).

GUARTANTANGA CAIVINAGUA, Eduardo Sebastian; & SIGUENCIA URGILES, Klever Geovanny. Recuperación de suelo contaminado con cobre y plomo mediante métodos biológicos al interior del campamento Guarumales [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca, Ecuador. 2019. pp. 1-109. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/17835/1/UPS-CT008444.pdf>.

HERZKA, Sharon; et al. *Atlas de línea base ambiental del Golfo de México* [En línea], 2020, (México) 3(2), pp. 1-2. [Consulta: 2021-02-19]. Disponible en: https://atlasigom.cicese.mx/map_data/T004/ATLAS-TOMO-04.pdf.

JIMÉNEZ VÉLEZ, Vilma Cecibel. Evaluación de bacterias y hongos potencialmente utilizables para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad Agraria del Ecuador, Ecuador. 2020. pp. 126. Disponible en: https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/JIMENEZ_VELEZ_VILMA_CECIBEL.pdf?fbclid=IwAR3unQKeuUIExmXdpNKWc52ICtFIps2fK-AVwde1IrbYpdERRo7jZeuSBoE.

LÓPEZ DE MESA, Benavides Joaquín; et al. Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia. 2006. p. 87. Disponible en: www.unicolmayor.edu.com.

LUDEÑA MENDEZ, Paola Norka. Evaluación del potencial degradador de hidrocarburos por bacterias del género *Pseudomonas* aisladas de suelos agrícolas de Casa Blanca, Pachacámac [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad Católica Sedes Sapientiae, Perú. 2020. pp. 34-35. Disponible en: [https://repositorio.ucss.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14095/828/Tesis - Ludeña Mendez%2C_Paola_Norka.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.ucss.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14095/828/Tesis_Ludeña_Mendez%2C_Paola_Norka.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

MAE. *Reforma texto unificado legislación secundaria, medio ambiente, libro VI, decreto*

ejecutivo 3516 [En línea]. Quito-Ecuador: LEXIS FINDER, 2015. [Consulta: 2022-02-24]. Disponible en: <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/05/Acuerdo-61.pdf>

MARTÍNEZ PRADO, Adrian; et al. "Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* [En línea], 2011,(México) 27 (3), pp. 241-252. [Consulta: 2011-08-19] Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37020226009>.

MENESES PARRA, Rosalba Xiomara. Biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en microcosmos de suelo a campo abierto [En línea] (Trabajo de Titulación). (Ingeniería) Universidad Politécnica Salesiana de Cuenca, Ecuador. 2014. pp. 1-121. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/8974/1/UPS-CT005259.pdf>.

MORANTE CARRIEL, Laura. Bacterias Degradadorasde Hidrocarburos a Partir De Sueloscontaminados Con Hidrocarburos en el cantón Quevedo [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. 2018. p. 56. Disponible en: <http://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/5029>.

MUÑOZ CUAICAL, Stalin David. Evaluación de la eficacia de *Trichoderma sp* y *Pseudomona sp* para biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad Politécnica Salesiana Sede-Quito, Ecuador. 2016. p. 125. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13228/1/UPS-QT10474.pdf>.

ÑUSTEZ CUARTAZ, Diana Cristina. Biorremediacion para la degradacion de Hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estacion de Servicio Combustible [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia. 2012. p. 3. Disponible en: <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/7b71c653-d52e-4931-9fd3-5d6017a692ff/content>.

ORDOÑEZ JIMÉNEZ, Jean Pierre. Remediación de suelos contaminados por residuos de hidrocarburos (HTP's) no volátil procedentes de mecánicas automotrices mediante el uso de biochar [En línea] (Trabajo de Titulación). (Ingeniería) Universidad Católica de Cuenca, Ecuador. 2021. pp. 1-71. Disponible en: <https://dspace.ucacue.edu.ec/handle/ucacue/7954>.

PÉREZ POZO, Marco Rafael. Evaluación de la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando *Pseudomonas fluorescens* [En línea] (Trabajo de Titulación).

(Ingeniería) Universidad Politécnica Salesiana sede Quito, Ecuador. 2018. p. 7. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15446/1/UPS-QT12601.pdf>.

PINTO VARÓN, David Leonardo; & SÁNCHEZ VARGAS, Victor Daniel. Biorremediación de Suelos Contaminados por Hidrocarburos Mediante la Utilización de Diferentes Cepas Bacterianas a Escala de Laboratorio [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad Libre, Colombia. 2018. p. 74. Disponible en: [https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/15451/Proyecto de investigación Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante la ut.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/15451/Proyecto%20de%20investigaci%C3%B3n%20de%20biorremediaci%C3%B3n%20de%20suelos%20contaminados%20por%20hidrocarburos%20mediante%20la%20utilizaci%C3%B3n%20de%20cepas%20bacterianas%20a%20escala%20de%20laboratorio.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

PUENTE ENCALADA, Jessenia Alexandra; & CAMPOVERDE RENTERIA, Kevin Ismael. Evaluación de la capacidad de fitorremediación y tolerancia de un suelo contaminado por hidrocarburos, en el sector San José, cantón Cuyabeno, provincia de Sucumbíos, utilizando *phaseolus vulgaris*, *zea mays*, *sorghum vulgare* y *panicum máximum jacq* [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, Ecuador. 2022. p. 65. Disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>.

QUIROZ ARANGO, Lina María. Evaluación de *pseudomonas sp.* solubilizadora de fósforo, nativa de suelos del piedemonte llanero artificialmente contaminados con diésel [en línea], (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad San Tomás, Colombia. 2019. pp. 1-19. Disponible en: <https://repository.usta.edu.co/handle/11634/18399>

RIERA FARAONE, Nadia. Purificación y caracterización de un metabolito antifúngico producido por *Pseudomonas fluorescens* [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad de la República de Uruguay, Uruguay. 2012. pp. 70-71. Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/1469>.

RODRÍGUEZ GONZALES, Apolonia; et al. "Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar biorremediación". *Revista de ciencias ambientales* [En línea], 2022, (Costa Rica) 56 (1) p. 196. [Consulta: 2021-09-26] Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2215-38962022000100178

SOLANO CHUMPITAZ, María Cristina. Hidrocarburos alifáticos [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad Nacional de Educación Enrique Guzmán y Valle, Perú. 2019. p. 40. Disponible en: <https://repositorio.une.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14039/6520/MONOGRAFÍA-SOLANO>

CHUMPITAZ MARIA CRISTINA - FAC.pdf?sequence=5&isAllowed=y.

SUÁREZ BELTRAN, Rolan Mauricio. Guía de métodos de biorremediación para la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad Libre, Colombia. 2013. p. 10. Disponible en: [https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/10607/TRABAJO_FINAL cd.pdf](https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/10607/TRABAJO_FINAL_cd.pdf).

TORRES ORDÓÑEZ, Mishell Fernanda. Percepción social respecto a suelos contaminados por hidrocarburos en la parroquia san carlos, perteneciente al cantón Joya de los Sachas, provincia de Orellana [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador. 2019. pp. 5-10. Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/17431/TESIS.pdf?sequence=1>.

TRUJILLO TORO, María Alejandra; & RAMÍREZ QUIRAMA, Juan Fernando. "Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia". *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* [en línea], 2012, (Colombia) 3 (2), pp. 37. [Consulta: 2013-09-04] Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5344956>.

VALENZUELA, Ibonne; et al. Técnicas De Biorremediación De Suelos Contaminados Por Hidrocarburos Con Fines De Uso En El Municipio De Tibú, Norte De Santander [En línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría) Universidad Francisco de Paula Santander, Colombia. 2021. pp. 107-118. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/8234914.pdf>.

VALLEJO, Victoria; et al. "Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo -Bioestimulation process during the biodegradation of TPH in oil contaminated soil". *Revista Colombiana de Biotecnología* [En línea], 2005, (Colombia) 8 (2), pp. 67-78. [Consulta: 2015-03-24]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77670209>.

Cristian Tenelanda.S.
4-7-2023.



ANEXOS

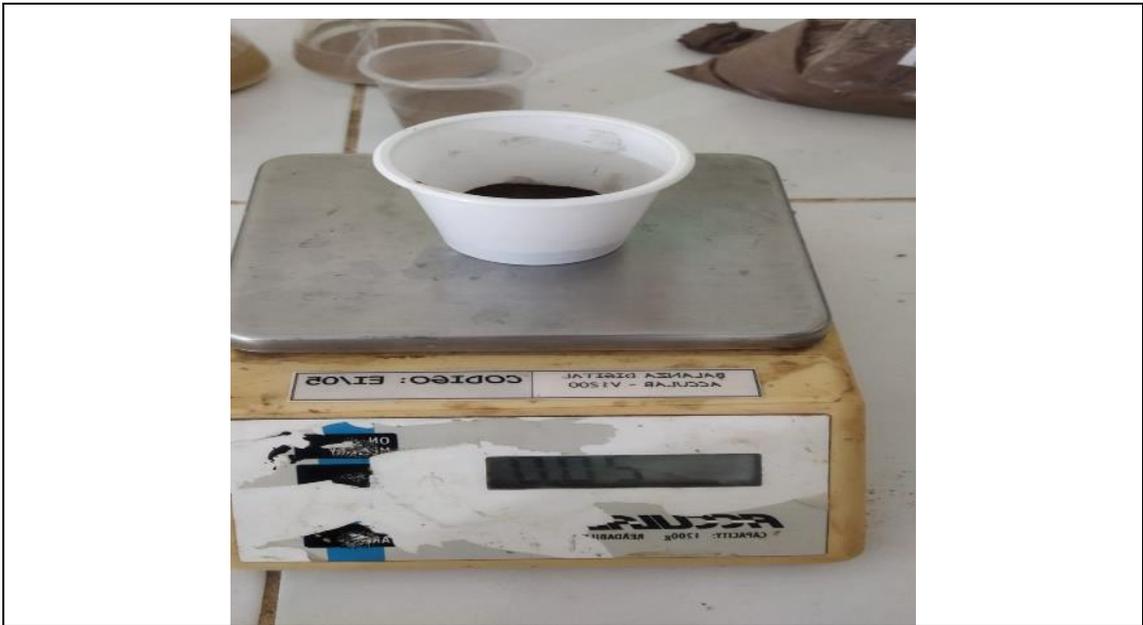
ANEXO A: MUESTREO DE SUELO





ANEXO B: DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICO

- PH DEL SUELO







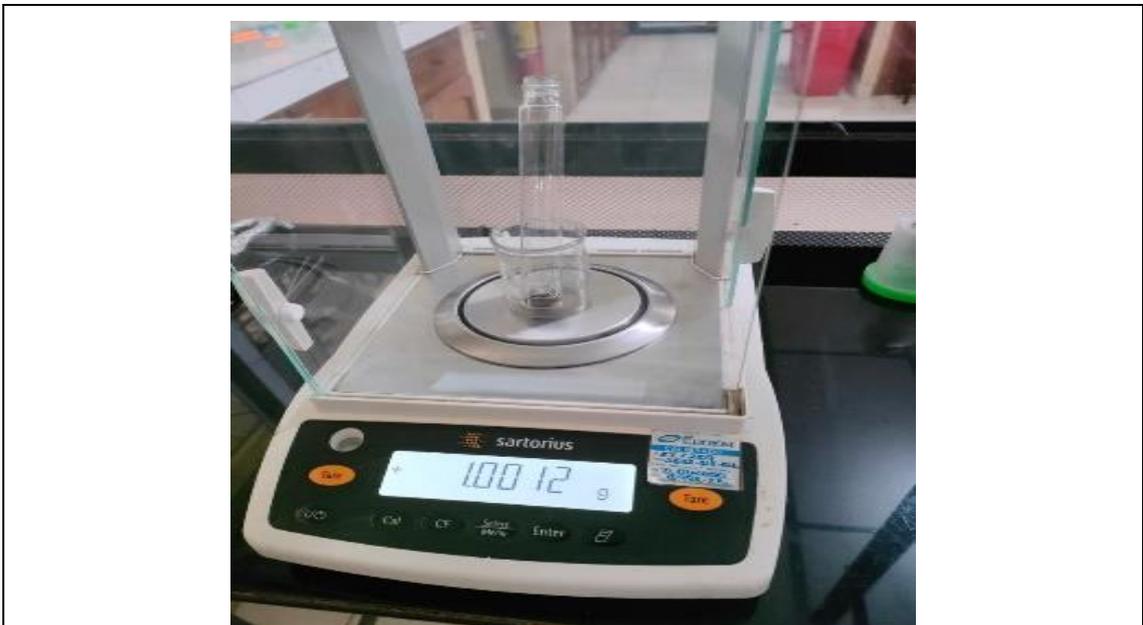
- CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (CE) DEL SUELO

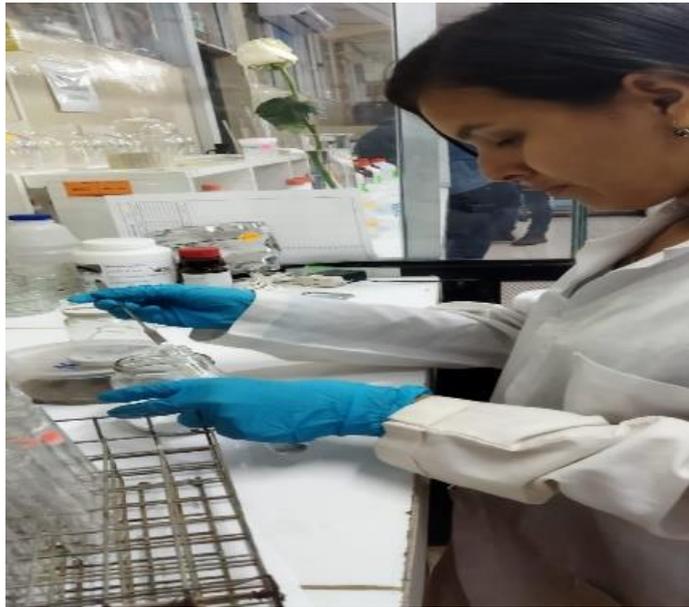






- TPH DEL SUELO







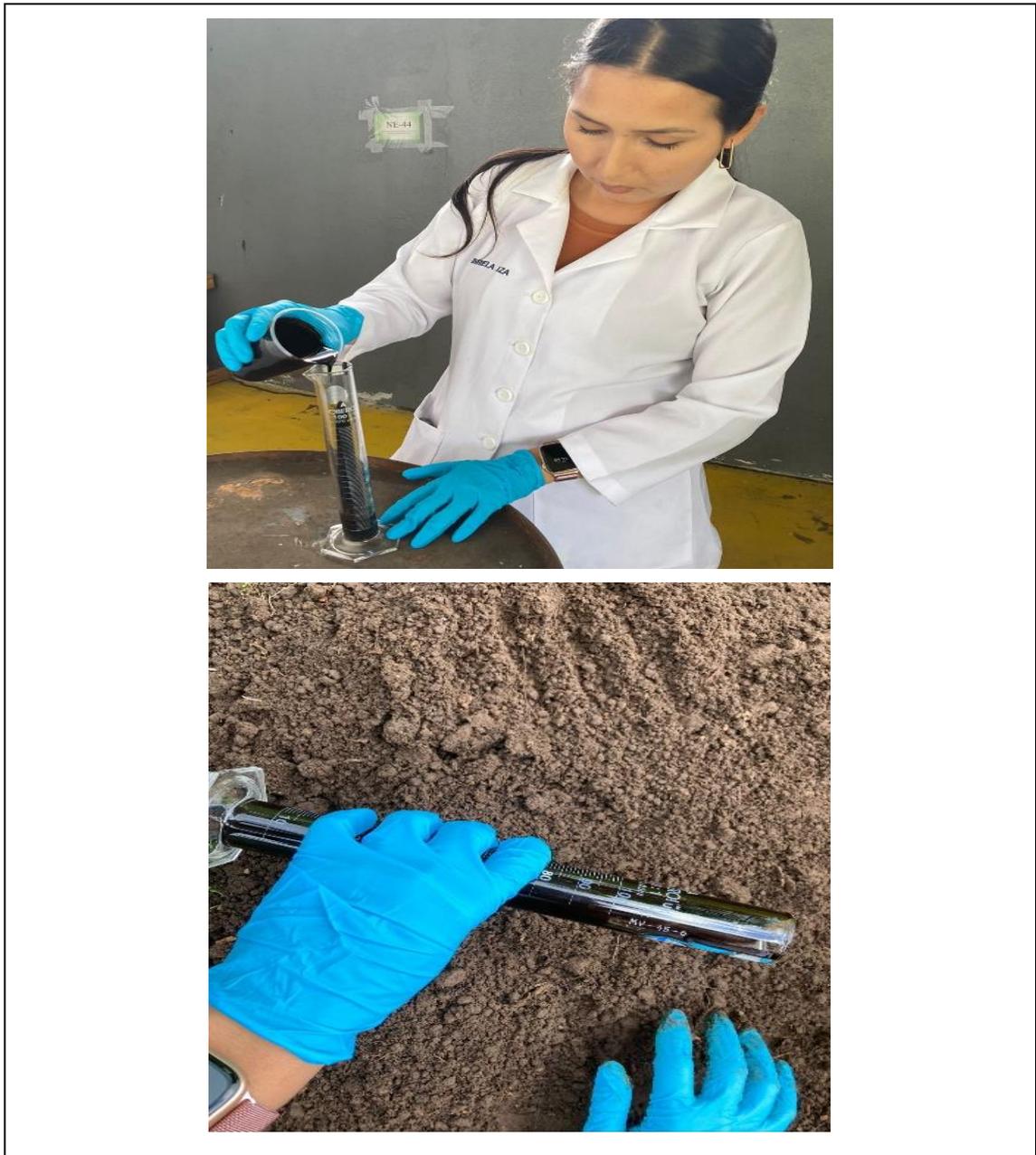




ANEXO C: ESTERILIZACIÓN DEL SUELO

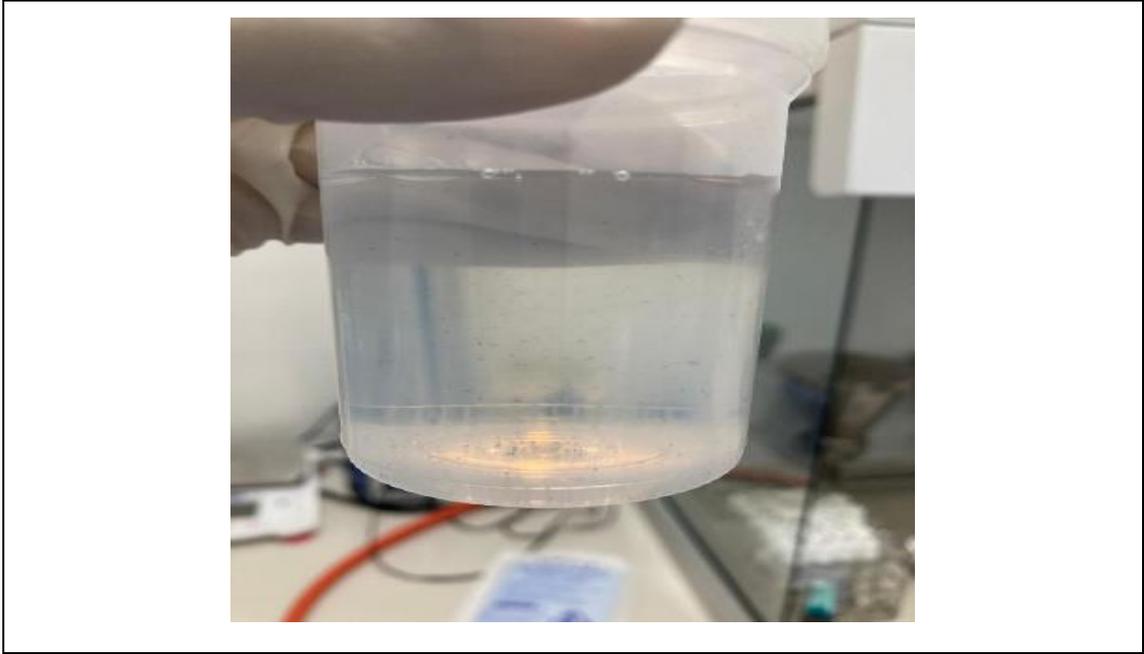


ANEXO D: CONTAMINACIÓN DEL SUELO CON HIDROCARBUROS









ANEXO G: DILUCIONES SERIADAS





ANEXO H: DISTRIBUCIÓN DEL SUELO EN LAS CAJAS





ANEXO I: APLICACIÓN DE LA BACTERIA *PSEUDOMONA FLUORESCENS* EN EL SUELO CONTAMINADO CON TPH





ANEXO J: INOCULACIÓN Y CONTEO DE *PSEUDOMONA FLUORESCENS*







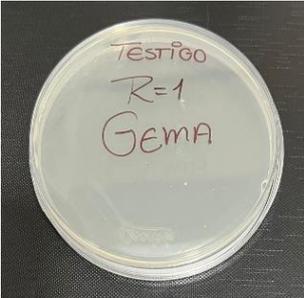


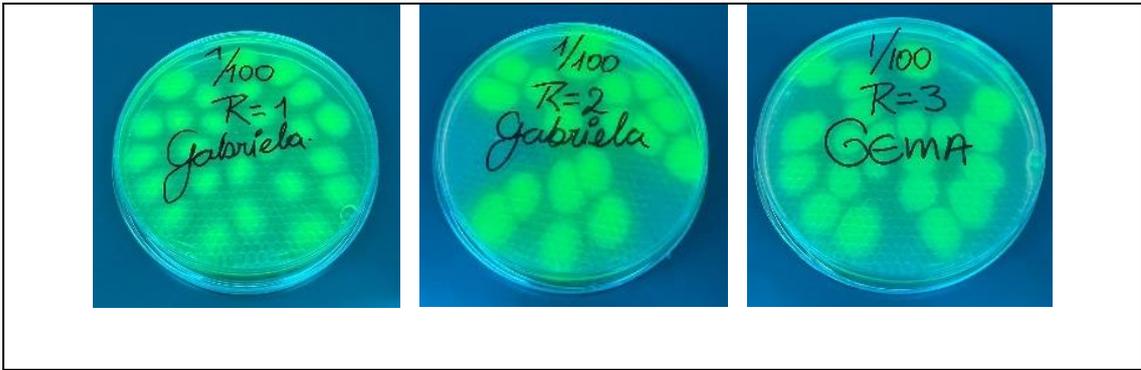




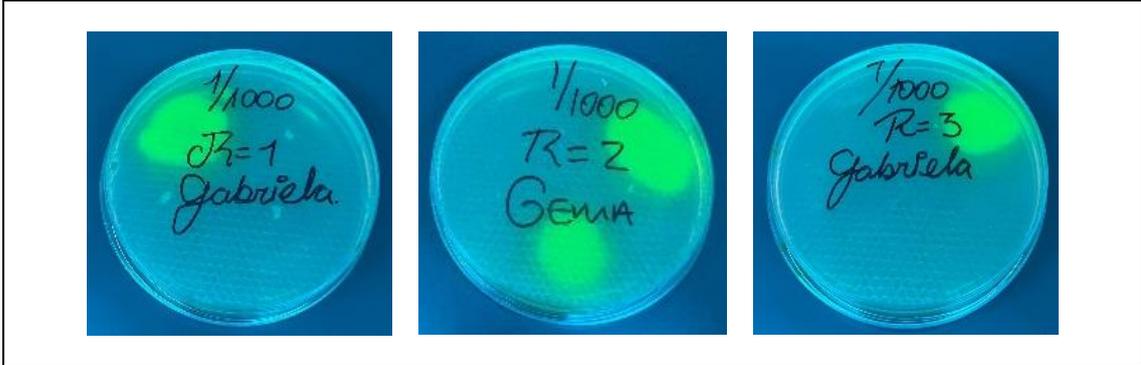


Tabla 4-11: Cuantificación al Inicio

Testigos		
 <p>Testigo R=1 GEMA</p>	 <p>Testigo R=2 Gabriela.</p>	 <p>Testigo R=3 Gabriela.</p>
<p>Tratamiento 1×10^{-1} (R1=42, R2=48, R3=44 Colonias)</p>		
 <p>1/10 R=1 GEMA</p>	 <p>1/10 R=2 Gabriela.</p>	 <p>1/10 R=3 GEMA.</p>
<p>Tratamiento 1×10^{-2} (R1=25, R2=18, R3=21 Colonias)</p>		
<p> </p>		



Tratamiento 1×10^{-3}
(R1=1, R2=2, R3=1 Colonias)

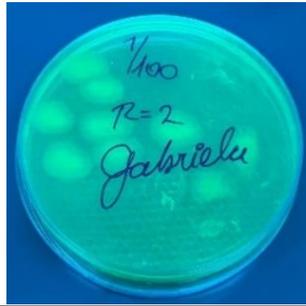
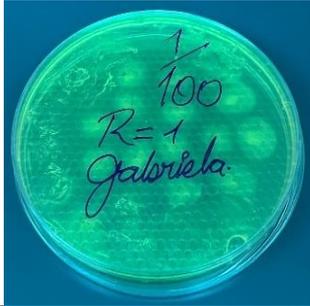


Elaborado por: Iza L. y Vera G., 2023

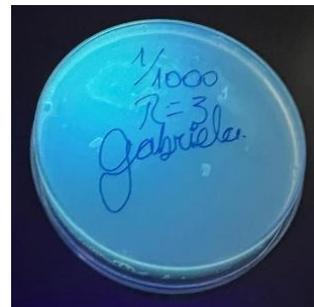
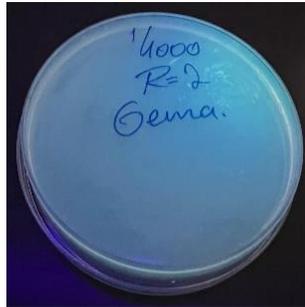
Tabla 4-12: Cuantificación al Final

Testigo		
Tratamiento 1×10^{-1}		

Tratamiento 1×10^{-2}
(R1=13 , R2=9 , R3=9 Colonias)



Tratamiento 1×10^{-3}
(R1=1 , R2=2 , R3=1 Colonias)





esPOCH

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 4 / 7 / 2023

INFORMACIÓN DE LAS AUTORAS
Nombres – Apellidos: Lizeth Gabriela Iza Bósquez Gema Karolina Vera Sánchez
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias.
Carrera: Ingeniería Ambiental.
Título a optar: Ingeniera Ambiental.
f. responsable: Ing. Cristian Sebastian Tenelanda Santillan.

Cristian Tenelanda, S.
4-7-2023.



1211-DBRA-UPT-2023