ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

SEDE ORELLANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA INGENIERÍA AMBIENTAL

BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO USANDO BACTERIAS NATIVAS DEL GÉNERO *Pseudomonas* spp.

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA AMBIENTAL

AUTORAS: CECILIA CARMEN MALA CORTEZ

LESLI MARGOTH QUINGATUÑA ANDY

DIRECTORA: ING. TANNIA JAZMÍN VARGAS TIERRAS, MSc.

El Coca – Ecuador

2024

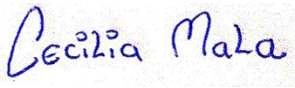
© 2024, Cecilia Carmen Mala Cortez y Lesli Margoth Quingatuña Andy

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

Nosotras, Cecilia Carmen Mala Cortez y Lesli Margoth Quingatuña Andy, 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, 27 de junio de 2024



Cecilia Carmen Mala Cortez
2200149892

Lesli Margoth Quingatuña Andy
2200270045

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA INGENIERÍA AMBIENTAL

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; tipo: Proyecto de Investigación, **BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO USANDO BACTERIAS NATIVAS DEL GÉNERO *Pseudomonas* spp**, realizado por las señoritas: **CECILIA CARMEN MALA CORTEZ** y **LESLI MARGOTH QUINGATUÑA ANDY**, 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. Carlos Mestanza Ramón, Ph.D. **PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**		2024-06-27
Ing. Tannia Jazmín Vargas Tierras, M. Sc. **DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**		2024-06-27
Ing. Sandra Elizabeth Suárez Cedillo, M. Sc. **ASESORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**		2024-06-27

DEDICATORIA

Este trabajo se la dedico a mis padres, Katty y Dionicio, por haberme dado la vida y el apoyo necesario para iniciar mis estudios académicos. También quiero dedicarles este logro a mis hermanas, especialmente a Shirley y Bertha, por haber estado presentes en cada momento en el que necesité de su ayuda y por el amor incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida. A mis sobrinos, quienes han sido mi mayor motivación para seguir adelante en esta carrera, y a mi padrino Oscar y a mi vecina Ibelia por haberme prestado su ayuda cuando más la necesité. Por último, se las dedico a mis queridas mascotas, quienes con su amor iluminaron cada noche en la que tuve que trasnochar estudiando. En especial, a mi perra Nena que dejó una huella imborrable en mi vida, regalándome los mejores momentos durante los años que compartimos. ¡Gracias a todos por ser parte de este importante paso en mi vida!

Cecilia

Con afecto se lo dedico a todas aquellas personas que me han apoyado a lo largo de esta travesía universitaria, siendo parte ya sea de manera directa o indirecta de este logro. A mi madre Margoth, pilar fundamental en mi vida, quien ha sido ejemplo de tenacidad y perseverancia, sabiéndome guiar lo largo de los años me ha formado en la mujer que soy, que con su incondicional amor y apoyo hace posible la culminación de mi formación profesional. A mis hermanos y hermana por su apoyo moral y confianza en aquellos momentos de fragilidad durante la carrera universitaria, gracias eternas. Los quiere, Lesli.

Lesli

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por haberme permitido nacer en mi familia. Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por darme la oportunidad de estudiar la carrera que, aunque al principio no era mi sueño, se convirtió en lo que más amo y valoro en mi vida. Agradezco a la institución por guiarme hacia un camino que ahora considero mi pasión y por brindarme las herramientas necesarias para mi crecimiento académico y personal. También agradezco a mis maestros por sus enseñanzas y conocimientos, los cuales ampliaron mi horizonte y me mostraron un mundo diferente al que conocía. Expreso mi gratitud al laboratorio AQLAB por abrirme sus puertas para realizar el Trabajo de Integración Curricular, y a cada uno de sus miembros por guiarme a lo largo de este proceso. Agradezco a mi tutora, la Ing. Tannia Vargas, y a mi asesora, la Ing. Sandra Suarez, por contribuir con sus conocimientos y orientarme en la etapa final de mi carrera.

Cecilia

Agradezco a Dios por permitirme vivir este momento de éxito, además de guiarme en todas las decisiones que conllevaron durante mi formación profesional. A mi familia, mi mamá Margoth por acompañarme en este camino a pesar de las dificultades a las que se ha enfrentado, mis hermanos y hermana por su apoyo brindado en aquellos momentos en los que los necesité, A la pareja de mi madre Enrique por su ayuda brindada cuando llegué a requerirla. A mi directora y asesora Ingeniera Tannia Vargas e Ingeniera Sandra Suárez por su predisposición a ayudarme en la elaboración de este trabajo de integración curricular al compartirme tiempo, conocimientos y experiencias en las revisiones de este trabajo.

Al Laboratorio AQLAB y quienes lo conforman, en especial al ingeniero Armando Melendrez por permitirme realizar la parte experimental de este trabajo de integración curricular, de igual manera a los ingenieros Melisa, José, Guido y Nelson quienes me ayudaron a ejecutar exitosamente los análisis requeridos.

Lesli

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS xi

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES xii

ÍNDICE DE ANEXOS xiii

RESUMEN xiv

ABSTRACT xv

INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN 3

1.1 **Planteamiento del problema** 3

1.2 **Objetivos** 4

1.2.1 ***Objetivo Genera***l 4

1.2.2 ***Objetivos Específicos*** 4

1.3 **Justificación** 5

1.4 **Pregunta** 5

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO 6

2.1 **Referencias teóricas** 6

2.1.1 ***Suelo*** 6

2.1.1.1 *Importancia del suelo* 6

2.1.1.2 *Tipo de suelo* 6

2.1.2 ***Contaminación del suelo*** 7

2.1.2.1 *Los contaminantes* 7

2.1.3 ***Técnicas de tratamientos del suelo*** 12

2.1.3.1 *Tratamientos biológicos (biorremediación)* 14

2.1.3.2 *Tratamientos de remediación fisicoquímicos* 15

2.1.3.3 *Tratamientos de remediación térmicas* 16

2.1.4 ***Microorganismos degradadores*** 16

2.1.4.1 *Levaduras* 17

2.1.4.2 *Hongos* 17

2.1.4.3 *Bacterias* 17

2.1.5 ***Métodos para la identificación de bacterias*** 18

2.1.6 ***Pseudomonas*** 20

2.1.6.1 *Pseudomona aeruginosa* 21

2.1.6.2 *Pseudomona fluorescens* 21

2.1.7 ***Análisis físicos-químicos del suelo*** 21

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO 23

3.1 **Localización del estudio** 23

3.2 **Enfoque de la investigación** 23

3.3 **Alcance de la investigación** 24

3.4 **Tipo de investigación** 24

3.5 **Diseño de investigación** 24

3.5.1 ***Diseño experimental*** 25

3.6 **Materiales, instrumentos, insumos y preparación de medios de cultivos** 26

3.6.1 ***Preparación de mezclas*** 27

3.6.1.1 *Agar selectivo cetrimida* 27

3.6.1.2 *Conservación de cepas* 28

3.7 **Metodología para el proceso de biorremediación del suelo** 28

3.7.1 ***Aislamiento de las bacterianas Pseudomonas spp. del suelo contaminado con TPHs utilizando el método de agotamiento por estría para la identificación de las especies*** 28

3.7.1.1 *Siembra bacteriana* 28

3.7.1.2 *Técnica de aislamiento por agotamiento por estría* 29

3.7.1.3 *Identificación de las bacterias del género Pseudomonas* 31

3.7.2 ***Incrementación de población de Pseudomonas spp. mediante una concentración de escala McFarland 0.5, determinando el comportamiento de la densidad bacteriana en el proceso de biorremediación.*** 32

3.7.2.1 *Activación de las cepas* 33

3.7.2.2 *Preparación del estándar McFarland 0.5* 33

3.7.2.3 *Preparación e inoculación de la suspensión bacteriana de $1x10^8$ UFC/mL* 34

3.7.2.4 *Monitoreos de los parámetros fisicoquímicos* 35

3.7.2.5 *Siembra y recuento de las colonias* 36

3.7.3 ***Evaluación de la eficiencia de Pseudomonas spp. determinando el porcentaje de remoción de TPHs, comparando con los límites establecidos en la normativa*** 37

3.7.3.1 *Hidrocarburos totales de petróleo (TPHs)* 37

CAPÍTULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS 38

4.1 **Resultados** 38

4.1.1 ***Resultados del aislamiento de las bacterias Pseudomonas spp del suelo contaminado con hidrocarburos utilizando el método de agotamiento por estrías para la identificación de las especies.*** 38

4.1.2 ***Resultados de la incrementación de población de Pseudomonas spp. mediante una concentración de escala McFarland 0.5, determinando el comportamiento de la densidad bacteriana en el proceso de biorremediación.*** 41

4.1.3 ***Resultados de la evaluación de la eficiencia spp. determinando el porcentaje de remoción de TPHs, comparándolos con los límites establecidos en la normativa*** 43

4.2 **Discusión** 46

4.3 **Comprobación de la pregunta** 47

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 48

5.1 **Conclusiones** 48

5.2 **Recomendaciones** 49

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1: Clasificación de la textura del suelo 7

Tabla 2-2: Tipos de contaminantes 9

Tabla 2-3: Clasificación de los tratamientos de remediación 13

Tabla 2-4: Concentraciones aproximada de bacterias en suspensión 15

Tabla 2-5: Levaduras, hongos y bacterias degradadoras de TPHs..... 16

Tabla 2-6: Clasificación de la familia Pseudomonadacae..... 20

Tabla 2-7: Límites permisibles de TPHs en suelo según sus usos 22

Tabla 3-1: Diseño completamente al azar..... 25

Tabla 3-2: Materiales, instrumentos, reactivos e insumos. 26

Tabla 4-1: Resultado de las pruebas para identificación de *Pseudomonas* nativas..... 38

Tabla 4-2: Resultado de la prueba molecular..... 41

Tabla 4-3: Densidad bacteriana de los Tratamientos 41

Tabla 4-4: ANOVA de la densidad bacteriana de los tratamientos 42

Tabla 4-5: Prueba de Tukey de la densidad bacteriana de los tratamientos..... 43

Tabla 4-6: Resultado de la remoción de TPHs en los tratamientos 44

Tabla 4-7: ANOVA de TPHs..... 45

Tabla 4-8: Prueba de Tukey de TPHs 45

Tabla 4-9: Porcentaje de remoción de TPH en los tratamientos 45

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 3-1: Mapa de ubicación del estudio 23

Ilustración 3-2: Método para la siembra de bacterias 29

Ilustración 3-3: Técnica de agotamiento por estrías por fases 30

Ilustración 3-4: Estándar McFarland de 0.5 34

Ilustración 4-1: Caracterización microscópica de la *P. fluorescens* 39

Ilustración 4-2: Caracterización microscópica de la *P. aeruginosa* 39

Ilustración 4-4: Prueba de oxidasa de la *P. aeruginosa* 40

Ilustración 4-3: Prueba de oxidasa de la *P. fluorescens* 40

Ilustración 4-6: Prueba de catalasa de la *P. aeruginosa* 40

Ilustración 4-5: Prueba de catalasa de la *P. fluorescens* 40

Ilustración 4-7: Densidad Bacteriana de los tratamientos 42

Ilustración 4-8: Remoción de TPHs de los tratamientos 44

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: REGISTRO FOTOGRÁFICO DE LA FASE DE LA ELABORACIÓN

ANEXO B: CERTIFICADO DE AUTENTICIDAD DE LA PRUEBA DE OXIDASA

ANEXO C: RESULTADOS DE LAS PRUEBAS MOLECULARES DE LOS AISLADOS BACTERIANOS

ANEXO D: CONTROLES DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS

RESUMEN

Para abordar la contaminación del suelo por hidrocarburos, se han utilizado tratamientos térmicos, fisicoquímicos y biológicos, en estos procesos puede existir el desprendimiento de sustancias dañinas que alteran su composición, haciendo que la remediación tarde varios años. Afectando la salud del suelo, por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue biorremediar suelos contaminados con hidrocarburos totales de petróleo usando bacterias nativas del género *Pseudomonas* spp. para el cumplimiento de los límites permisible establecidos en la normativa vigente. La metodología implementada tuvo un enfoque cualitativo y cuantitativo, se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA), ya que se manipularon las variables y se desarrolló en un periodo de 45 días; la biorremediación se llevó a cabo en 300 Kg de suelo proveniente de los desechos del Laboratorio AQLAB, distribuidos en 3 tratamientos cada uno con 3 réplicas, el tratamiento (A) sin aplicarle una concentración bacteriana, los tratamientos (B) y (C) con una concentración de bacterias del género *Pseudomonas*, para la obtención de información se realizaron pruebas, técnicas y análisis. Pruebas morfológica, bioquímica y molecular, la técnica escala McFarland de 0.5 y análisis de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos. Logrando identificar la presencia de las especies de *Pseudomonas fluorescens* y *aeruginosa*, incrementando su densidad: tratamiento (A) 1,82E+7, tratamiento (B) 5,53E+10 y tratamiento (C) 9.37E+11 y finalmente los tratamientos (B) y (C) cumplieron los límites permisibles para uso comercial e industrial. Por lo cual se concluyó que la prueba molecular ofreció un resultado preciso en la identificación de las especies, además, las bacterias aisladas demostraron la capacidad de adaptación, evidenciadas a través de 3 fases: adaptación, crecimiento exponencial y estacionaria, en este estudio la especie *P. aeruginosa* (94,4 por ciento) demostró una mayor eficiencia en el porcentaje de remoción de TPHs en relación con la *P. fluorescens* (89,6 por ciento).

Palabras clave: < PSEUDOMONAS >, < PRUEBAS >, < BIOAUMENTACIÓN >, < DENSIDAD BACTERIANA >, < HIDROCARBUROS >, <SUELO >, < LÍMITES PERMISIBLES>.

Cristian Tenelanda. S.

Ing. Cristian Sebastian Tenelanda S. 0959-DBRA-UPT-2024

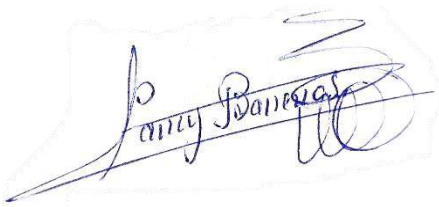
0604686709

ABSTRACT

To address soil contamination by hydrocarbons, thermal, physicochemical and biological treatments have been used, in these processes exist the harmful substances release alter its composition, making remediation take several years. Therefore, research objective was to bioremediate contaminated soils with total petroleum hydrocarbons using native bacteria of genus *Pseudomonas* spp. to comply with permissible limits established in the current regulations. The methodology implemented had a qualitative and quantitative approach, a completely randomized experimental design (CRD) was used, since variables were manipulated and developed over a period 45 days; The bioremediation was carried out 300 kg of soil from AQLAB Laboratory waste, distributed in three treatments each with 3 replicates, treatment (A) without applying a bacterial concentration, treatments (B) and (C) a bacteria concentration of *Pseudomonas* genus, tests, techniques and analysis were carried out to obtain information. Morphological, biochemical and molecular tests McFarland scale technique 0.5 and a physicochemical and microbiological parameters analysis. The *Pseudomonas fluorescens* presence and *aeruginosa* species was identified, increasing their density: treatment (A) 1.82E+7, treatment (B) 5.53E+10 treatment (B) 5.53E+10. and treatment (C) 9.37E+11 and finally treatments (B) and (C) found permissible limits for commercial and industrial use. Therefore, it was concluded the molecular test offered an accurate result in species identification. In addition, isolated bacteria demonstrated the adaption capacity, evidenced through 3 phases: adaptation, exponential and stationary growth, this study the species *P. aeruginosa* (94.4 percent) showed a higher efficiency in removal percentage TPHs in relation to *P. fluorescens* (89.6 percent).

Key words: < PSEUDOMONAS >, < TESTS >, < BIOAUGMENTATION >, < BACTERIAL DENSITY >, < HYDROCARBONS >, <SOIL >, <PERMISSIBLE LIMITS>.

Translated by:



Lcda. Nancy de las Mercedes Barreno Silva. Mgs
DOCENTE ESPOCH SEDE-ORELLANA

INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento y explotación de los recursos naturales es un tema clave en el desarrollo humano. Participando en ello, el sector petrolero como principal representante en el progreso económico de varios países desde finales del siglo XIX hasta la actualidad. (Alfaro y Denyer, 2021, págs.88-89) El petróleo es usado como materia prima energética, por ello tanto su precio y demanda ha ido en aumento, tal es así que para el año 2020 el costo del barril oscilaba entre 39 a 42 dólares, mientras que para el año 2022 su precio aumentó a 94 y 99 dólares por barril. (Banco Mundial, 2023, pág. 1) Las reservas mundiales de este recurso se encuentran principalmente en tres regiones el Medio Oriente, el Mar Caspio y América Latina y el Caribe. (Fajardo, 2020, pág. 1059) América Latina alberga el 21.17% de las reservas mundiales, disponiendo de 331 260 millones de barriles de petróleo. (Organización de Países Exportadores de Petróleo, 2023, pág. 2)

En Ecuador la extracción de crudo representa un ingreso económico importante, produciendo 175 55 millones de barriles de petróleo en 2022, de los cuales, a 116 66 millones de barriles, se exportaron por un valor de USD 10 013,12 millones de dólares. (Banco Central del Ecuador, 2023, págs. 5-15) El país cuenta con más de 9 000 pozos perforados, ubicados en su gran mayoría en la Región Amazónica en las provincias de Sucumbíos, Orellana, Napo, Pastaza y Morona Santiago (Delgado y Narváez, 2020, pág. 7) en las que se desarrollan actividades de explotación, refinación, comercialización, distribución, transporte y almacenaje de crudo. (Rodríguez et al., 2022, pág. 179) paralelamente el desarrollo de estas actividades ha ocasionado 630 derrames a nivel nacional entre los años de 2020 y 2022, de los cuales empresas del estado son responsables del 97% de estos derrames. (Ruiz, 2022, pág. 2)

Orellana y Sucumbíos son las provincias en las que se han instalado la mayoría de las industrias nacionales e internacionales**,** (Licta, 2020, págs. 1-6) lo que ha provocado que el entorno se vuelva más frágil ocasionando impactos ambientales, sociales y económicos. (Pulido et al., 2022, pág. 6) En este sentido la contaminación por hidrocarburos totales de petróleo (TPHs) en el suelo afecta la flora, fauna incluyendo los microorganismos nativos, (Cavazos et al., 2014, pág. 540) ocasionando la infertilidad y esta su vez disminuye la producción de cultivos dado que los hidrocarburos inhiben producción de la fotosíntesis ocasionando la muerte de la planta; del mismo modo los animales enferman o mueren debido a los desechos tóxicos que genera la interacción del suelo y el petróleo. (González et al., 2021, pág. 9; Arellano et al., 2015, pág. 226) Así también perjudica la forma de vida de las poblaciones, ya que estos compuestos al ser tóxicos para los seres vivos (mutagénicos y carcinogénicos) para el año 2 019 había causado 2 000 muertes por cáncer (Cavazos et al., 2014, págs. 540-541; González et al., 2021, pág. 10)

A fin de remediar la contaminación del suelo se han implementado tecnologías o tratamientos térmicos, fisicoquímicos y biológicos. Térmicos como la incineración y la desorción térmica, su coste alcanza los 1 957 $/ m^3 con una efectividad del 99,99% en condiciones óptimas de operación. Físico-químicos como la extracción con solventes, barreras verticales, electro remoción, procesos de oxidación avanzada, etc. Costando 720 $/ m^3 con efectividad del 95% o superior dependiendo la técnica aplicada y operación óptima (Hurtado, 2010, págs. 14-32; Said, 2018, págs. 46-62), la desventaja de estos procesos es el desprendimiento de sustancias dañinas que alteran su composición, haciendo que la remediación tarde varios años. (Muñoz, 2016, pág. 1) Por último, los tratamientos biológicos o biorremediación en el cual se usan organismos vivos como la fitorremediación, biofiltración, biopilas, bioestimulación y bioaumentación con una efectividad del 97% y con costos de 163 $/$m^3$ (Suarez, 2013, págs. 4-13; Fundación Chile, 2015, págs. 54-101).

De acuerdo a Licta la bioaumentación es una técnica que se usa con frecuencia para el tratamiento de suelos contaminados con TPHs (Licta, 2020, pág. 3), su eficiencia alcanza el 61% - 98% de remoción dependiendo de las condiciones fisicoquímicas del suelo, el tiempo de biorremediación y la selección de microorganismos idóneos para desarrollarse en el medio contaminado (Ortiz et al., 2005, pág. 57; Pino et al., 2012, pág. 103), las bacterias más utilizadas para este fin son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia rubidae*, *Bacillus* sp, *Micrococcus* sp, *Brevibacterium* sp, *Spirillum* sp, *Xanthomonas*, *Alcaligenes* etc (Maposita et al., 2010, págs. 8-9), dado su capacidad metabólica, logrando metabolizar y mineralizar el contaminante a CO_2 y H_2O así estos compuesto puedan ser incorporados al medio ambiente fácilmente (Gómez et al., 2008, pág. 78).

Para la elección adecuada de este tipo de microorganismos es mediante pruebas sucesivas de crecimiento poblacional, en cultivos ricos en petróleo, (Rivera et al., 2002, págs. 423-424) o a su vez el aislamiento de bacterias degradadoras de petróleos nativas del suelo contaminado que posteriormente se las utiliza para biorremediarlo, de esta manera se evalúa la adaptación, tolerancia y supervivencia de las bacterias a elevadas concentraciones de esta sustancia (Pérez et al., 2008, pág. 45), ya que al utilizar microorganismos externos pueden presentar problemas de adaptación minimizando el éxito del tratamiento (Rodríguez et al., 2017, págs. 35-40).

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del problema

El suelo es crucial para la producción de alimentos y otras actividades humanas, pero se ve amenazado por los derrames de petróleo causados por la industria hidrocarburífera. En Ecuador durante el período comprendido entre 2020 y 2022 se registraron aproximadamente 630 derrames de petróleo, el Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE) menciona que ocurren 22,5 derrames al mes y 5,6 semanales entre ellos 125 son derrames de nivel 3 que constituyen a emergencias ambientales. (Ruiz, 2022, pág. 35)

El derrame de petróleo genera efectos negativos para varios subsistemas, incluyendo árboles, fauna asociada y microorganismos, tanto aerobios como anaerobios (Olguín et al., 2007, pág. 139). Además, influye en la salud humana causando intoxicaciones, enfermedades como el cáncer e incluso lamentables pérdidas humanas. Los recursos naturales como el suelo evidencian cambios significativos en su composición y estructura debido a la presencia de hidrocarburos, al ser de naturaleza altamente tóxica y no degradable (Goya, 2020, pág. 80; Cavazos et al., 2014, pág. 546).

La alteración de las condiciones fisicoquímicas del suelo, como el pH, conductividad eléctrica y humedad, son indispensables para el desarrollo óptimo de plantas y microorganismos debido a que el pH influye en el aumento de los elementos fitotóxicos y la actividad microbiana, así como en la solubilidad de los nutrientes (potasio, magnesio, fósforo, calcio), es decir, en la forma en que las plantas pueden utilizarlos (Vázquez, 2017, pág. 156; Bienes y Marques., 2017, pág. 4). La conductividad eléctrica depende de la concentración de sales influyendo en el crecimiento de plantas y microbiota (Vega, 2021, pág. 17). Además, la baja humedad puede afectar el desarrollo de los microorganismos o incluso llevarlos a la muerte, por ejemplo, el protoplasto de las bacterias necesita grandes cantidades de agua para llevar a cabo las reacciones bioquímicas necesarias para su supervivencia (Caicedo et al., 2021, págs. 1-8).

La ausencia de microorganismos en el suelo puede resultar perjudicial, dado que estos son responsables de la transformación de compuestos orgánicos e inorgánicos, liberando nutrientes que las plantas necesitan paran su alimentación. Estas transformaciones también cumplen un papel vital en la filtración, degradación y eliminación de contaminantes presentes en el agua y suelo (ONU, 2020, págs. 2-4). Con el fin de abordar la contaminación del suelo por hidrocarburos, se

han utilizado tratamientos fisicoquímicos durante años. Sin embargo, estos tratamientos han demostrado ser parcialmente efectivos, ya que liberan sustancias químicas dañinas que alteran su estado y prolongan el tiempo necesario para su recuperación (Muñoz, 2016, pág. 1).

Para analizar los contaminantes del suelo existen laboratorios ambientales como AQLAB (Laboratorios de Análisis y Evaluación Ambiental), donde se receptan muestras que tienen su origen en distintos contextos. Algunas de las cuales provienen de las industrias hidrocarburíficas, siendo resultado de perforaciones o de derrames (Cavazos et al., 2014, pág. 546). También se reciben muestras de instituciones educativas, donde se manipulan sustancias peligrosas como TPHs con fines educativos. Al realizan estos análisis se generan desechos, en muchos casos considerados peligrosos para la salud y el entorno. Aunque la cantidad de desechos producidos suele ser relativamente pequeña, no se debe subestimar la importancia del problema (Gadea y Guardino, 2023, pág. 1).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Biorremediar suelos contaminados con hidrocarburos totales de petróleo usando bacterias nativas del género *Pseudomonas* spp. para el cumplimiento de los límites permisible establecidos en la normativa vigente.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Aislar las bacterias *Pseudomonas* spp. del suelo contaminado con hidrocarburos utilizando el método de agotamiento por estrías para la identificación de las especies.
- Incrementar la población de *Pseudomonas* spp. mediante una concentración de escala McFarland 0.5, determinando el comportamiento de la densidad bacteriana en el proceso de biorremediación.
- Evaluar la eficiencia de las *Pseudomonas* spp. determinando el porcentaje de remoción de TPHs, comparándolos con los límites establecidos en la normativa.

1.3 Justificación

El MAATE es el organismo encargado de asegurar la calidad, conservación, restauración y sostenibilidad de los recursos naturales (Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica, 2023, pág. 1). A través de algunas normativas ambientales vigentes como es el caso del Acuerdo Ministerial 097-A, Anexos de Normativa, Reforma Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente. En el Anexo 2: Norma de Calidad Ambiental del Recurso Suelo y Criterios de Remediación para Suelos Contaminados, específicamente en la Tabla 2 Criterios de Remediación (Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica, 2015, págs. 35-36), se establecen los valores máximos permitidos para suelo de uso agrícola, industrial, comercial y residencial. El parámetro de TPH debe ser menor a 150 mg/kg para uso agrícola, para residencial es de 230 mg/kg y para los otros usos es de 620 mg/kg. Estos límites son importantes para garantizar la calidad del suelo y la protección del medio ambiente (Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica, 2015, págs. 35-36).

En ese sentido, el laboratorio AQLAB tiene la responsabilidad integral de gestionar sus desechos desde su generación hasta su disposición final, conforme al primer principio ambiental del Código Orgánico del Ambiente (COA, 2020, págs. 13-24). Además, el Servicio de Acreditación Ecuatoriana (SAE) solicita la adecuada gestión de los desechos generados, esto puede llevarse a cabo a través de gestores ambientales o como en este estudio por medio de Trabajos de Integración Curricular. Es por esto que en los últimos años nace la necesidad de buscar soluciones a la problemática, al utilizar microorganismos nativos degradadores adaptados a las condiciones ambientales a fin de remediar la contaminación del suelo con hidrocarburos totales de petróleo. (Schroeder et al., 1999, pág. 162).

1.4 Pregunta

¿Las bacterias aisladas e identificadas son capaces de biorremediar el suelo contaminado con hidrocarburos totales de petróleo?

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Referencias teóricas

2.1.1 Suelo

Se denomina suelo al recurso natural presente de forma constante desde el comienzo de los tiempos en el desarrollo del planeta y generación de la vida (Chitiva, 2021, pág. 7), compuesto a partir de una mezcla de materia orgánica, minerales y nutrientes apto para sostener el crecimiento de los organismos, formando un sistema estructurado, heterogéneo y fundamental e irremplazable (Torres, 2019, pág. 19) que comprende desde la parte superficial de la corteza terrestre hasta diferentes niveles de profundidad (Pari y Yacolca, 2019, pág. 12).

2.1.1.1 Importancia del suelo

Su importancia radica en que es este el hábitat de los seres humanos, animales y plantas, razón por la cual es unos de los ecosistemas más complejos y biodiversos de la tierra (Obispo y Ramos, 2019, pág. 28). De acuerdo con el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente el suelo es fundamental en el sistema alimentario, pues de él proviene el 95% de los alimentos. Al estar saludable produce alimentos sanos que nutren a las personas y animales (ONU Programa para el Medio Ambiente, 2018). Sin embargo, al ser un recurso no renovable, susceptible y de difícil restauración es indispensable en el desarrollo de ciclos biogeoquímicos, que permiten la realización de las funciones para la naturaleza, sociedad y economía (Ruiz, 2019, pág. 5).

2.1.1.2 Tipo de suelo

Un dato importante que se necesita considerar es el tipo de suelo, en particular su textura, pues esta determina sus características físicas (Acuña et al., 2009, pág. 73). Esta propiedad define los porcentajes de material mineral: arena, limo y arcilla que conforman el suelo (Vera, 2016, pág. 7), teniendo la arena partículas más gruesas (2 - 0.05 mm), seguido del limo (0.05 – 0.002mm) y finalmente la arcilla (menores a 0.002mm) (Gómez, 2012, págs. 28-29). Moldeando su porosidad y la solubilidad de las sustancias al movilizarse por el suelo, lo que influye en las condiciones de interacción con agentes externos (Niño, 2023, pág. 31). En la Tabla 2-1 se muestra la clasificación de los suelos de acuerdo con la relación arena-limo-arcilla.

Tabla 2-1: Clasificación de la textura del suelo

Tipos de suelo	Textura	Relación arena-limo-arcilla %
Livianos	Arenoso	90-5-5
	Arenoso franco	80-15-5
	Franco arenoso	65-25-10
	Franco	40-40-20
Medios	Franco limoso	20-65-15
	Franco arcilloso arenoso	35-35-30
Pesados	Franco arcilloso	35-30-35
	Franco arcillo limoso	10-35-55
	Limoso	10-85-5
	Arcillo arenoso	55-5-40
	Arcillo limoso	5-50-45
	Arcilloso	10-20-60

Fuente: (Mendoza y Pazo, 2021, págs. 11-12)

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

2.1.2 Contaminación del suelo

La contaminación del suelo se produce, por ejemplo, cuando sustancias tóxicas ingresan al medio ambiente en concentraciones que superan su capacidad natural de purificarse a sí mismo, lo que altera sus condiciones físicas, químicas y biológicas (FAO, 2021, págs. 3-5). Existen dos categorías principales de acciones de contaminación del suelo: naturales y causadas por actividades humanas.

Las actividades humanas, como la deposición de residuos y los vertidos o derrames industriales, pueden tener un impacto negativo en la calidad del suelo (Fernández, 2009, pág. 54). La presencia de contaminantes como el petróleo en el suelo puede ser un riesgo para la salud humana y el ecosistema. En algunos casos, la contaminación no solo provoca problemas de toxicidad, sino que también puede ocasionar grandes riesgos de explosiones e incendios (Ñustez, 2012, pág. 10).

2.1.2.1 Los contaminantes

Se consideran contaminantes todo tipo de sustancia o energía que afecta un sistema como parte de su propio funcionamiento o introducido en él, que tienen efectos parcial o total. Este concepto es aplicable incluso a la utilidad de los recursos como el medio ambiente en general. Los

compuestos contaminantes se liberan al suelo, agua y aire de dos formas: La contaminación puntual causada por diversos sucesos o por un evento concreto dentro de un lugar específico, donde se pueden identificar fácilmente su origen y similitud (Salas, 2023, págs. 18-19) y la contaminación difusa, que no tiene una única fuente identificable, sino que puede provenir de múltiples fuentes de contaminación (Bienes y Marques, 2017, págs. 1-4).

Los contaminantes están presentes en concentraciones mayores a las habituales en los recursos naturales, además tienen origen geológicos y antropogénicos. Los de tipo geológicos proceden de la roca madre en la que se forma el suelo como actividades volcánicas, mientras que los antropogénicos provienen de las actividades humanas los mismos que produce desechos peligrosos (Galán y Romero, 2008, págs. 48-60).

- Tipos de contaminantes

Desde la perspectiva del estado de agregación de la sustancia, los contaminantes pueden ser gaseosos, líquidos o sólidos. Sus fuentes principales son la acumulación de basura residual de la industria y el sector residencial, los desechos de la construcción y la minería, el derrame de hidrocarburos, la agricultura y la ganadería (Hernández, et al., 2006, págs. 463-469), así como la actividad militar. Los contaminantes gaseosos del suelo se deben mayormente a procesos químicos y biológicos relacionados con la degradación de los residuos antes descritos (CEPLAN 2023, págs. 24-27).

Los contaminantes líquidos provienen directamente del vertimiento de sustancias como los derivados del petróleo (gasolina, diésel, aceites). Estos, junto con otros tipos de residuos mineros, industriales y de la construcción y de herbicidas, fungicidas y abonos químicos, se disuelven parcialmente en agua. Las inundaciones y la infiltración son agentes que propagan la contaminación al manto freático y grandes extensiones de terrenos aguas abajo (Martínez y López, 2001, pág. 4).

En particular el vertimiento accidental o intencionado de petróleo crudo y sus derivados son contaminantes líquidos con una alta incidencia en la calidad del suelo. Al recombinarse con las sustancias inherentes al suelo provocan alteraciones, incluso permanentes o de muy larga duración, en la calidad del suelo (Morales et al., 2019, pág. 2) (González et al., 2021, págs. 1-9) y mediante los escurrimientos y la infiltración, contaminan grandes extensiones aguas abajo y el manto freático.

Muchas de las fuentes antes descritas, al recombinarse químicamente con otras sustancias presentes en los contaminantes, o en el suelo, generan desechos sólidos. En particular los hidrocarburos tienen un alto impacto en la calidad del suelo, al alterar directamente sus propiedades fundamentales: textura, pH, conductividad térmica, humectación (Mejía, 2010, pág. 25).

Otro criterio de clasificación los contaminantes es su naturaleza, desde esta perspectiva se ordenan de acuerdo con su origen inorgánico, orgánico y biológico como se observa en la Tabla 2-2 (Hernández, 1999, págs. 1-6).

Tabla 2-2: Tipos de contaminantes

Tipos de contaminantes	
Compuestos inorgánicos	Metales (plomo), y minerales no metálicos.
Contaminantes biológicos	Microorganismos (contaminación con huevos de geohelmintiasis).
Compuestos orgánicos	Volátiles y persistentes (Hidrocarburos Totales de Petróleo)

Fuente: (Fernández, 2009, pág. 54)
Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

- *Compuestos inorgánicos*

En general se consideran sustancias inorgánicas a aquellas que en su composición química no figura el carbono. Ellos se presentan como minerales, óxidos, sales, ácidos, entre otros. En la industria química se utilizan como materias primas y la fabricación de otras. Son ampliamente utilizados en la industria electrónica, en la elaboración de baterías recargables, en la medicina y la farmacia, entre las más recurrentes (Carey y Giuliano, 2014, págs. 80-90). Fundamentalmente en forma de nitratos, sulfatos y carbonatos disueltos en el agua, son sustancias contaminantes del suelo, que afectan sus propiedades.

Otro contaminante de gran impacto ambiental son los metales pesados, presentes en desechos industriales y de la construcción, con si incidencia en la flora y los animales por ingesta de follaje

o aguas contaminadas (Bienes y Marques, 2017, págs. 1-4). Las plantas y microorganismos rizosféricos tienen la capacidad de absorber, al nutrirse, también esas sustancias nocivas, incorporándolas a sus organismos, incluyendo sus frutos y otras partes comerciables. Esto ocurre tanto para contaminantes orgánicos e inorgánicos.

- *Contaminantes biológicos*

Dentro de este concepto se incluyen los virus, hongos, bacterias, parásitos, ácaros, todo tipo de insectos trasmisores de enfermedades, el polen, entre otros. En general se deben a descomposición de elementos debido a la actividad de los organismos, afectando a los seres vivos, a los que incluso puede provocar la muerte (Hernández, 1999, págs. 1-6).

El suelo es un medio favorable para la proliferación de contaminantes biológicos. Según Hernández Calleja, Ana. (1999) supervivencia, reproducción y dispersión de estos contaminantes depende de factores tales como la temperatura, la humedad y las fuentes de alimento entre otras. En particular las altas temperaturas, favorecen su proliferación, aunque los mohos y levaduras se procrean bien en lugares a bajas temperaturas. Por su parte hongos, bacterias y ácaros del polvo doméstico se desarrollan mejor en ambientes húmedos (Hernández, 1999, págs. 1-6).

- *Compuestos orgánicos*

Los contaminantes orgánicos poseen la particularidad de que en su composición contienen carbono formando diferentes tipos o cadenas de enlace con otros átomos de carbono o con átomos de hidrógeno. En esos compuestos entran frecuentemente en su composición otras sustancias. Pueden ser de origen natural o sintetizados en la industria (Carey y Giuliano, 2014, págs. 80-90). Entre los contaminantes orgánicos de mayor impacto en la actualidad están los hidrocarburos.

Como señala Johana Velásquez (2017) los hidrocarburos son una de las principales fuentes de contaminación del suelo, no precisamente por la liberación de gases contaminantes durante su combustión, sino por derramamientos casuales o intencionados, sin embargo, al estar formados solo por átomos de carbono e hidrógeno son proclives a la biodegradación, particularmente en los suelos, lo que facilita la implementación de acciones para su descontaminación por derrames de hidrocarburos (Velásquez, 2017, pág. 156).

Específicamente los hidrocarburos de petróleo, al ser derramados en el suelo tienen efectos negativos en el crecimiento de las plantas, pues generan sustancias tóxicas que son absorbidas por estas en su proceso de alimentación y fotosíntesis (Cavazos et al., 2014, págs. 539-550.). Estudios como

los de Martínez, Víctor & López, Felipe (2001) muestran que la contaminación por hidrocarburos tiene efectos nocivos en los tres tipos de suelos debido a las variaciones que producen en sus propiedades fundamentales.

En ese estudio se constataron variaciones significativas en las partículas del suelo (arena, limo y arcilla) cuando la concentración de contaminantes como gasolina y diésel son altos, provocando una disminución en el contenido arcilloso y elevando el arenoso (Martínez & López, 2001, págs. 9-12). Se ha podido determinar el impacto negativo de los hidrocarburos del petróleo en el contenido de materia orgánica del suelo, la incidencia fluctuante en la conductividad eléctrica del suelo y una leve influencia en su pH (Martínez y López, 2001, págs. 9-12).

- **Hidrocarburos totales de petróleo**

Se emplea la expresión TPHs para referirse a una combinación compleja de hidrocarburos que se derivan principalmente del petróleo. Estos compuestos son considerados como contaminantes orgánicos persistentes cuando se encuentran en el entorno terrestre (Alava y Rugel, 2021, pág. 20). En la Tierra, el conglomerado más complicado de sustancias orgánicas es el petróleo crudo, en el que se han identificado más de 17 000 compuestos diferentes, aunque preponderan los hidrocarburos, oscilando entre un 50 y un 98 % de esa mezcla (Cavazos et al., 2014, págs. 539-550.), por esa razón varían en peso molecular desde el gas metano hasta los altos pesos moleculares de alquitranes y bitúmenes. Estas sustancias están compuestas principalmente por compuestos con diferentes niveles de solubilidad y volatilidad debido a que están formadas únicamente por átomos de carbono e hidrógeno, son compuestos orgánicos susceptibles a la biodegradación (Velásquez, 2017, pág. 156).

- **Tipos de hidrocarburos**

Aunque cada una de estas sustancias tienen su propia estructura específica, que condiciona la existencia de un gran abanico de formas y estructuras moleculares, ellas pueden congregarse en tres grupos: Alcanos, los naftenos y aromáticos.

Los alcanos se caracterizan por un alto grado de saturación y están compuestos solo de carbono e hidrógeno, entre ellos están el metano, el heptano, el hexano y el butano. Los naftenos, también llamados cicloparafinos, son sustancia que los átomos de carbono forman estructuras cíclicas en forma de anillos (Carey y Giuliano, 2014, págs. 80-90). Ellos están presentes en la gasolina proporcionando la posibilidad de usarlos a bajas temperaturas y confieren buenas características de viscosidad para la elaboración de lubricantes (Cruz y Licango, 2021, págs. 1-6).

Los hidrocarburos aromáticos se producen no solo durante la combustión incompleta del carbón, pues también se generan al quemar basura, el tabaco y preparar carnes a la parrilla, no obstante, sus fuentes de mayor importancia son el alquitrán proveniente de la hulla y el petróleo. Los dos grupos principales de hidrocarburos aromáticos son los monocíclicos, que incluyen el benceno, tolueno y xileno (BTEX), y los hidrocarburos policíclicos (HAPs), como el naftaleno, antraceno y fenantreno (Pizarro, 2021, pág. 16).

Como es sabido, los hidrocarburos han tenido y tienen un papel esencial en el desarrollo humano, no obstantes, tanto el petróleo crudo como sus derivados: combustibles, parafinas, aceites, entre otros, afectan de modo drástico la superficie del suelo, proceso en el que se corre el riesgo de que sean movilizados hacia capas más profundas llegando hasta el agua subterránea. Una vez en esta, debido a la escorrentía dichos contaminantes pueden afectar grandes zonas con una lata afectación al medio ambiente (Velásquez, 2017, pág. 156).

2.1.3 Técnicas de tratamientos del suelo

Un proceso tecnológico de tratamiento se refiere a cualquier acción individual o secuencia de acciones que modifica la composición de una sustancia dañina o contaminante mediante procesos químicos, físicos o biológicos, con el objetivo de disminuir la toxicidad, movilidad o volumen del material contaminado (Volke y Velasco, 2002, págs. 27-51). Como se muestra en la Tabla 2-3, existen diversos métodos como los fisicoquímicos que se utilizan para recuperar suelos afectados por contaminantes como son la extracción con vapor, lavado de suelos, solidificación y estabilización, desorción térmica, separación electrocinética, incineración, neutralización, extracción con solventes, oxido reducción y deshalogenación química. Aunque estos métodos son eficaces para eliminar los contaminantes del suelo, en su mayoría son soluciones temporales o trasladan la problemática a otros medios (Kopytko et al., 2009, págs. 35-46). La biorremediación se perfila como el único tratamiento de recuperación de suelos, ya que transforma a los contaminantes en sustancias inoculas para el ambiente, también es eficiente y económica (Morales et al. 2019. pág. 2).

Tabla 2-3: Clasificación de los tratamientos de remediación

Clasificación de los tratamientos de remediación	
Tratamientos biológicos (biorremediación)	Tratamientos in situ ○ Bioventeo ○ Bioestimulación ○ Bioaumentación ○ Biolabranza ○ Fitorremediación Tratamientos ex situ ○ Biorremediación en fase sólida (composteo) ○ Biorremediación en fase de lodos (biorreactores)
Tratamientos de remediación fisicoquímicos	○ Remediación electrocinética ○ Lavado de suelos ○ Extracción por solvente ○ Inundación de suelos ○ Extracción de vapores ○ Solidificación ○ Estabilización
Tratamientos de remediación térmicas	○ Desorción térmica ○ Incineración ○ Vitrificación ○ Pirólisis

Fuente: (Volke y Velasco, 2002, págs. 27-51)

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

2.1.3.1 Tratamientos biológicos (biorremediación)

Los contaminantes llamados no degradables en realidad son compuestos que se descomponen de modo muy lento, por lo que se requiere para su desaparición del medio ambiente largos tiempos. La biorremediación es un catalizador de ese proceso que consiste en el empleo de seres vivos para reducir o transformar contaminantes que normalmente serían perjudiciales para un sistema (López, 2019, pág. 1).

La eliminación de sustancias tóxicas, como los hidrocarburos de petróleo en el suelo, se basa en la habilidad de degradación del petróleo por parte de los microorganismos presentes, como bacterias, plantas, hongos y protistas (Hung et al., 2008, págs. 1-3). Se puede potenciar la biorremediación utilizando productos comerciales, así como nutrientes o nitrógeno para ayudar en este tratamiento (Naeth et al., 2024, pág. 337). La biorremediación de suelos se puede dividir en dos estrategias: in situ y ex situ. La biorremediación in situ se refiere al tratamiento biológico de suelos contaminados sin excavar antes del tratamiento. Por otro lado, la biorremediación ex situ se refiere a tratar el suelo contaminado en un lugar dispuesto para esto. Las estrategias in situ presentan mayores ventajas sobre las ex situ (Ñustez, 2012, pág. 10). Entre los tipos de biorremediación encontramos la fitorremediación, la bioaumentación, bioestimulación, bioaireación, biolabranza, compostaje, biorreactores, entre otros.

- Bioaumentación

Es una técnica de biorremediación el cual se basa en la adición controlada de microorganismos degradadores autóctonos o ajenos al sitio contaminado, para degradar los compuestos o transformarlos a otros menos tóxicos, de esta manera acelerar el tiempo de degradación (Pino et al., 2012, págs. 101-108). Esta técnica se ha utilizado con buenos resultados para la recuperación del suelo, no obstante, el referido proceso depende de parámetros específicos del tipo de suelo tales como pH, granulación, disponibilidad de nutrientes y tipos de contaminantes (Pino et al., 2012, págs. 101-108).

En ese sentido, existen diferentes técnicas de recuento para determinar el número de organismos, incluyendo los métodos directos como la determinación del peso seco y la determinación de nitrógeno total, también métodos indirectos como métodos ópticos de turbidimetría y escala McFarland (Rojas, 2011, págs. 42-43).

Los estándares McFarland se utiliza para conocer el número aproximado de bacterias en suspensiones líquidas o en medios de cultivos y sirve para comparar la turbidez de las suspensiones con el estándar establecido, existen diferentes concentraciones en soluciones (Vega, 2021, pág.17), como se observa en la Tabla 2-4.

Tabla 2-4: Concentraciones aproximada de bacterias en suspensión

Estándar McFarland	1% $BaCl_2$ (en ml)	1% H_2SO_4 (en ml)	Densidad de células por ml aproximada (UFC)/U
0.5	0,05	9.95	$1.5x10^8$
1.0	0.1	9.9	$3.0x10^8$
2.0	0.2	9.8	$6.0x10^8$
3.0	0.3	9.7	$9.0x10^8$
4.0	0.4	9.6	$1.2x10^8$
5.0	0.5	9.5	$1.5x10^8$
6.0	0.6	9.4	$1.8x10^8$
7.0	0.7	9.3	$2.1x10^8$
8.0	0.8	9.2	$2.4x10^8$
9.0	0.9	9.1	$2.7x10^8$
10	10	9.0	$3.0x10^8$

Fuente: (Vega et al., 2022, pág. 79)

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

2.1.3.2 Tratamientos de remediación fisicoquímicos

La remediación fisicoquímica, como su nombre lo indica es una maniobra que se utiliza para enfrentar la contaminación de suelos que, al igual que la Bioaumentación, requiere de la evaluación de diferentes métodos disponibles, en dependencia de las cualidades de la zona a aplicar y el tipo de contaminante (Morales et al., 2019, pág. 2). En ese sentido las técnicas basadas en métodos físicos y químicos pueden facilitar la reducción del contenido de hidrocarburos en el suelo. En este tipo de tratamiento de remediación se usa las propiedades físicas y las químicas de los contaminantes, o hasta del medio contaminado para eliminar, contener y separa la contaminación. Además, es costoso (Volke y Velasco, 2002, págs. 27-51).

En este tipo de tratamiento se basa en las propiedades físicas y las químicas de los contaminantes y requiere además de la delimitación de las características del medio contaminado para eliminar, contener y separa la contaminación, no obstante, es un procedimiento costoso (Volke y Velasco, 2002, págs. 27-51). Por ejemplo, la utilización de oxidantes fuertes en suelos contaminados es una alternativa que ha mostrado ser efectiva.

2.1.3.3 Tratamientos de remediación térmicas

Este tipo de tratamientos de remediación, se usa calor para aumentar la volatilización que viene siendo la separación, quemar, descomponer y fundir los contaminantes presentes en el suelo. Además, comparados con los otros dos tipos de tratamiento este es el más costoso (Volke y Velasco, 2002, págs. 27-51). Se basa en la evaporación física del contaminante mediante su calentamiento hasta el punto de ebullición.

El tratamiento térmico a temperaturas relativamente bajas (250-650 °C) es una técnica fundamental para, de modo parcial o total, eliminar los hidrocarburos, los cuales reciben tratamiento posterior. El suelo recalentado se enfría para su eliminación o reutilización en otro lugar (Mata, 2010, págs. 8-10). Tiene como desventaja el costo elevado de la captura y tratamiento de los vapores emitidos.

2.1.4 Microorganismos degradadores

Microorganismos que a través de su capacidad metabólica contribuyen a la oxidación, degradación, transformación y completa mineralización de estos los contaminantes hidrocarburíferos (Vera, 2016, pág. 9). Los microorganismos con mayor capacidad degradadora de hidrocarburos son las levaduras, hongos y bacterias, como se observa en la Tabla 2-5 (Cando, 2011, pág. 87).

Tabla 2-5: Levaduras, hongos y bacterias degradadoras de TPHs.

Levaduras	Hongos	Bacterias
Candid	*Aspergillus*	*Acinetobacter*
Cryp-tococcus	*Candida*	*Arthobacter*
Yarrowiabv	*Corollospora*	*Aeromonas*
	Dendryphiella	*Alcaligenes*
	Fusarium	*Agrobacterium*

Meyerozyma	*Hansenula*	*Bacillus*
Rhodotorula	*Lulworthia*	*Cicrobacter*
	Mortierella	*Enterobacter*
Wickerhamia	*Phialophora*	*Erwinia*
	Penicillium	*Flavobacterium*
Rho-dosporidium	*Rhodotorula*	*Listonella*
	Sporobolomyces	*Pseudomonas*
Pichia	*Trichoderma*	*Rhodococcus*
	Variscosporina	*Vibrio*

Fuente: (Cando, 2011, pág. 87; Ramón, 2019, págs. 8-9)

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L.,2024

2.1.4.1 Levaduras

Son microorganismos eucariotas unicelulares, distribuidos ampliamente en la naturaleza, Pese a ello han sido poco estudiadas en el ámbito de la microrremediación. Su principal fuente de carbono y energía proviene de los azúcares, en condiciones anaeróbicas adquieren energía por medio de la fermentación, al estar en presencia de oxígeno utilizan la respiración aerobia como balance energético (Delgado, 2020, pág. 6; Padilla et al., 2021, pág. 178). Algunas levaduras pertenecientes al filo Ascomycota y Basidiomycota han sido aisladas de lugares contaminados con hidrocarburos, proponiéndose la especie *Candida tropicalis* para la remediación de suelos con petróleo (Chaires et al., 2018, pág. 41; Padilla et al., 2021, pág. 178).

2.1.4.2 Hongos

Son microorganismos eucariontes con paredes celulares rígidas, su proliferación se da por medio esporas a modo de reproducción, dichas esporas resisten el calor, la congelación y a algunas reacciones químicas, por lo que su presencia en el ambiente es amplia (Ishanoglu, 2010, págs. 2-3). La aplicación de hongos en la biorremediación representa una ventaja por su rápida adaptación a ambientes contaminados metabolizando metales pesado e hidrocarburos (Gómez et al., 2017, pág. 54; Trujillo et al., 2015, pág. 1).

2.1.4.3 Bacterias

Las bacterias tienen una capacidad metabólica excepcional y pueden descomponer casi cualquier sustancia orgánica. Su actividad puede ocurrir en presencia de oxígeno, lo que se conoce como

metabolismo aeróbico, o en ausencia total de oxígeno, lo que se conoce como metabolismo anaeróbico (Fabelo, 2017, pág. 55). Aquellas que crecen en presencia de hidrocarburos elaboran sustancias llamadas biosurfactantes que solubilizan compuestos no polares, como los contenidos en el petróleo (García et al., 2019, pág. 188).

2.1.5 Métodos para la identificación de bacterias

La taxonomía bacteriana busca establecer sistemas que faciliten la clasificación de las bacterias. Dentro de la clasificación taxonómica, se emplean categorías y definiciones clave, siendo las más comunes: familia (conjunto de géneros relacionados), género (grupo de especies relacionadas), especie (conjunto de cepas relacionadas), tipo (conjuntos de cepas interrelacionadas dentro de las especies, como biotipos o serotipos) y cepa (aislamiento específico de una especie) (López et al., 2015, págs. 28-34).

Las especies bacterianas se componen de grupos de cepas, también conocidos como clones, que comparten numerosas características comunes y presentan notables diferencias respecto a otras especies, las taxoespecies exhiben una marcada similitud fenotípica, mientras que las especies genómicas comparten un alto porcentaje en las bases de su ADN, además estas especies genotípicas muestran una gran homología en las secuencias de sus genes (Gobernado y López, 2003, págs. 56-59).

Para la identificación de bacterias existen métodos convencionales que se centran en sus características fenotípicas debido a que su ejecución y costo los hacen más accesibles, este tipo de pruebas se basan en las observables características de las bacterias, como su morfología, comportamiento en medios de cultivos, propiedades bioquímicas, fisiológicas, nutricionales y molecular. Es importante destacar que estos métodos pueden llevar a una identificación no precisa, ya que no todas las cepas de una misma especie presentan una característica específica. Por esta razón, se utilizan métodos genotípicos (pruebas moleculares) basadas en la secuencia del ARN ribosómico (ARNr) para lograr una identificación precisa de la especie bacteriana (Bou et al., 2011, págs. 601-608).

- Morfología

Los caracteres fenotípicos se obtienen a partir de la observación de la morfología bacteriana (tamaño, apariencia, esporas, flagelos, tipo de tinción) y del aspecto en los medios de cultivo (morfología, márgenes, elevación, textura, opacidad, pigmentación) (Gobernado y López, 2003, págs. 56-59). Las tinciones microbiológicas permiten la observación de microorganismos según su capacidad para retener o no colorantes, la tinción de Gram posibilita diferencias taxonómicas al separar dos grupos de bacterias: las gram positivas, que presentan una coloración violeta-azulada

y las gram negativas, que muestran un color granate o rojo rosado, según su respuesta a esta tinción. Además, permite diferenciar su morfología y forma de agruparse (López et al., 2015, págs. 28-34; Gobernado y López, 2003, págs. 56-59).

- Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas pueden clasificarse en rápidas y sencillas, así como lentas y complejas. Entre las rápidas y sencillas incluyen la detección de producción de catalasa mediante peróxido de hidrogeno (H_2O_2), solubilidad en bilis (desoxicolato de sodio), plasmocoagulasa en porta, actividad de citocromo oxidasa, entre otras (Gobernado y López, 2003, págs. 56-59).

Las pruebas de catalasa y oxidasa son ampliamente utilizadas para la identificación bacteriana debido a su rápida interpretación (Bou et al., 2011, págs. 601-608). La prueba de catalasa detecta la presencia de la enzima catalasa y está presente en microorganismos aeróbicos y anaeróbicos facultativos. Su función es descomponer H_2O_2, un subproducto de la oxidación de azúcares, ya que su acumulación puede resultar tóxica para las células (Ramirez et al., 2018, pág. 67). Por otro lado, la prueba de oxidasa identifica microorganismos con citocromooxidasa en su cadena respiratoria, clasificándolos como oxidasa positivos, estos pueden ser aerobios o anaerobios facultativos, para esta prueba se utilizan colorantes reactivos, como el clorhidrato de p-fenilendiamina, que actúan como aceptores de electrones en lugar de oxígeno este es inicialmente incoloro, se oxida en presencia de citocromooxidasa y oxígeno atmosférico, generando un compuesto azul de indofenol, esta prueba es especialmente útil para diferenciar las *Pseudomonas* y *Neisserias* (positivas para oxidasa) de las *Enterobacterias* (negativas para oxidasa) (Ramirez et al., 2018, pág. 67).

- Molecular

La secuencia del gen 16S rRNA se utiliza para la identificación molecular de bacterias a nivel de género, permitiendo también clasificar cepas a nivel de especie y subespecie, las longitudes de estas secuencias varían entre 500 y 1 550 pares de bases (pb), lo que posibilita su utilización para secuenciación y comparación en bases de datos. Sin embargo, es importante destacar que ocasionalmente puede haber excepciones en la utilidad de la secuenciación del gen ARNr 16S, especialmente cuando se trata de especies conocidas que tienen las mismas secuencias o muy similares (Clarridge, 2004. págs. 5-8).

– Medios de cultivos para aislar e identificar bacterias

Existen diferentes medios de cultivos para el aislamiento de bacterias, incluyendo medios no selectivos y selectivos; los medios no selectivos permiten el crecimiento de muchas especies

bacterianas diferentes, sin aislar una especie en particular, como el agar sangre, mientras los medios selectivos inhiben el crecimiento de otras especies para favorecer el crecimiento de una en particular, como el agar selectivo cetrimida (López et al., 2015, págs. 28-34).

2.1.6 Pseudomonas

Las *Pseudomonas* son bacterias aeróbicas, gram negativas, perteneciente a la subclase Proteobacterias gamma, cuya motilidad se da por flagelos polares (Paz et al., 2019, pág. 180). Este género se caracteriza por su gran versatilidad metabólica, además de su buena adaptabilidad a distintos medios, como suelo, agua y alimento (García et al., 2021, pág. 10). Las *Pseudomonas* producen biosurfactantes involucrados en procesos de remoción de aceites y productos similares, estos a su vez ayudan a la generación de enzimas degradadoras de hidrocarburos (Benavides et al., 2006, pág. 87). En la Tabla 2-6 se puede visualizar la clasificación de la familia Pseudomonadacae.

Tabla 2-6: Clasificación de la familia Pseudomonadacae

Clasificación de la familia Pseudomonadacae	
Grupo I de rRNA	**Grupo III de rRNA**
Grupo flurescente	**Grupo Acidovorans**
Pseudomonas aeruginosa	*Comamonans acidovorans*
Pseudomonas fluorscens	*Comamonans terrigena*
Pseudomonas putida	*Comamonans testosterona*
Grupo Stutzeri	**Grupo Facilis-delafieldii**
Pseudomonas stutzeri	*Acidovorax delafieldii*
Pseudomonas mendocina	*Acidovorax facilis*
Grupo Alcaligenes	*Acidovorax temperans*
Pseudomonas alcaligenes	**Grupo IV de rRNA**
Pseudomonas pseudoalcaligenes	***Grupo Diminuta***
Grupo II de rRNA	*Brevundimonas diminuta*
Grupo Pseudomallei	*Brevundimonas vesicularis*
Burkholderia mallei	**Grupo V de rRNa**
Burkholderia pseudomallei	*Stenotrophomonas maltophilia*
Burkholderia cepacia	**Homología de ácido nucleicos desconocidas**
Burkholderia gradioli	*Chryseomonas luteola*
Burkholderia pickettii	*Flavomonas orizyhabitans*
	Sphingomonas paucimobilis
	Shewanella putrefaciens

Fuente: (Guzmán Pérez, 2017, pág. 11)

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L.,2024

2.1.6.1 Pseudomona aeruginosa

Es un bacilo gram negativo aerobio, de fácil adaptación a distintos ambientes, tolera condiciones bajas de oxígeno, sobrevive con bajos niveles de nutrientes y crece en de temperaturas que van desde 4 hasta 42°C, a su vez producen biosurfactantes removiendo derivados de petróleo (Cevallos y García, 2018, pág. 14; Ochoa et al., 2013, pág. 138).

2.1.6.2 Pseudomona fluorescens

Pertenece al reino Bacteria, familia Pseudomonadaceae, género *Pseudomonas*. Es un bacilo aerobio Gram negativo, sus bacilos pueden ser curvos o rectos con flagelación polar; Su metabolismo es versátil acondicionándose en agua y suelo, crecen en un rango de temperatura de 5 °C hasta los 42°C, y en condiciones de pH neutro (Pérez, 2018, pág. 18).

2.1.7 Análisis físicos-químicos del suelo

La introducción intencionada o fortuita de hidrocarburos en el suelo provoca procesos físicos, químicos y biológicos que generalmente impactan de modo negativo en la calidad del suelo y consecuentemente de las aguas subterráneas, entre esos procesos destacan la disolución, la evaporación provocadas principalmente por las precipitaciones o el calentamiento diurno y la biodegradación biológica. Estos procesos conducen a una redistribución de los contaminantes con ponderación de la degradación microbiana catalizada por bacterias, algas, hongos y levaduras, el proceso de más importante que interviene en la eliminación total o parcial de los contaminantes (Pizarro, 2021, pág. 16; Alava y Rugel, 2021, pág. 20).

En ese sentido es fundamental la elección de métodos apropiados, que dependen de las funciones, propiedades o características principales a ser evaluadas (Pino et al., 2012, págs. 101-108). Las propiedades del suelo como el pH, conductividad eléctrica, temperatura y humedad son elementos fundamentales para supervisar el desarrollo bacteriano como la calidad del suelo.

La conductividad eléctrica es una de las cualidades esenciales del suelo a la hora de delimitar los métodos de biorremediación a utilizar ya que influyen en la biodegradación de compuestos. Su influencia está relacionada con la cantidad de sales presentes en el suelo, las que son indispensables en la nutrición de las plantas, no obstante, un exceso de ellas inhibe ese proceso. De ahí que los suelos contaminados con hidrocarburos afecten de modo importante la calidad del suelo, el procedimiento principal para su medición es la determinación de la cantidad de cationes o aniones disueltos en el suelo (Caicedo et al., 2021, págs. 1-8).

La temperatura y la humedad del suelo son factores importantes en la productividad del suelo, la medición de la temperatura suele realizarse de modo directo mediante un termómetro, que es óptima en el rango 18-25 ^{0}C a su vez es un factor importante en los procesos de bioremediación, mientras la humedad es la cantidad de agua contenida en suelo, la que depende de su estructura y composición (Caicedo et al., 2021, págs. 1-8).

Los TPHs resultan perjudiciales para el suelo, es fuente de alimentos para las bacterias. Estas se encuentran regidas por límites permisibles, los cuales están establecidos en el Anexo 2 del Acuerdo Ministerial 097 A, los valores correspondientes se detallan en la Tabla 2-7.

Tabla 2-7: Valores máximos permisibles de TPHs en suelo según sus usos

Parámetro	**Unidades**	**Uso de suelo**			
		Residencial	**Comercial**	**Industrial**	**Agrícola**
TPHs	mg/kg	230	620	620	150

Fuente:(Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica, 2015, págs. 35-36)

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1 Localización del estudio

La biorremediación del suelo contaminado con TPHs se llevó a cabo en la Provincia de Orellana en la cuidad del Coca en el Laboratorio AQLAB ubicado en las siguientes coordenadas 0.465615ºS 76.983408ºW a una elevación de 258 metros.

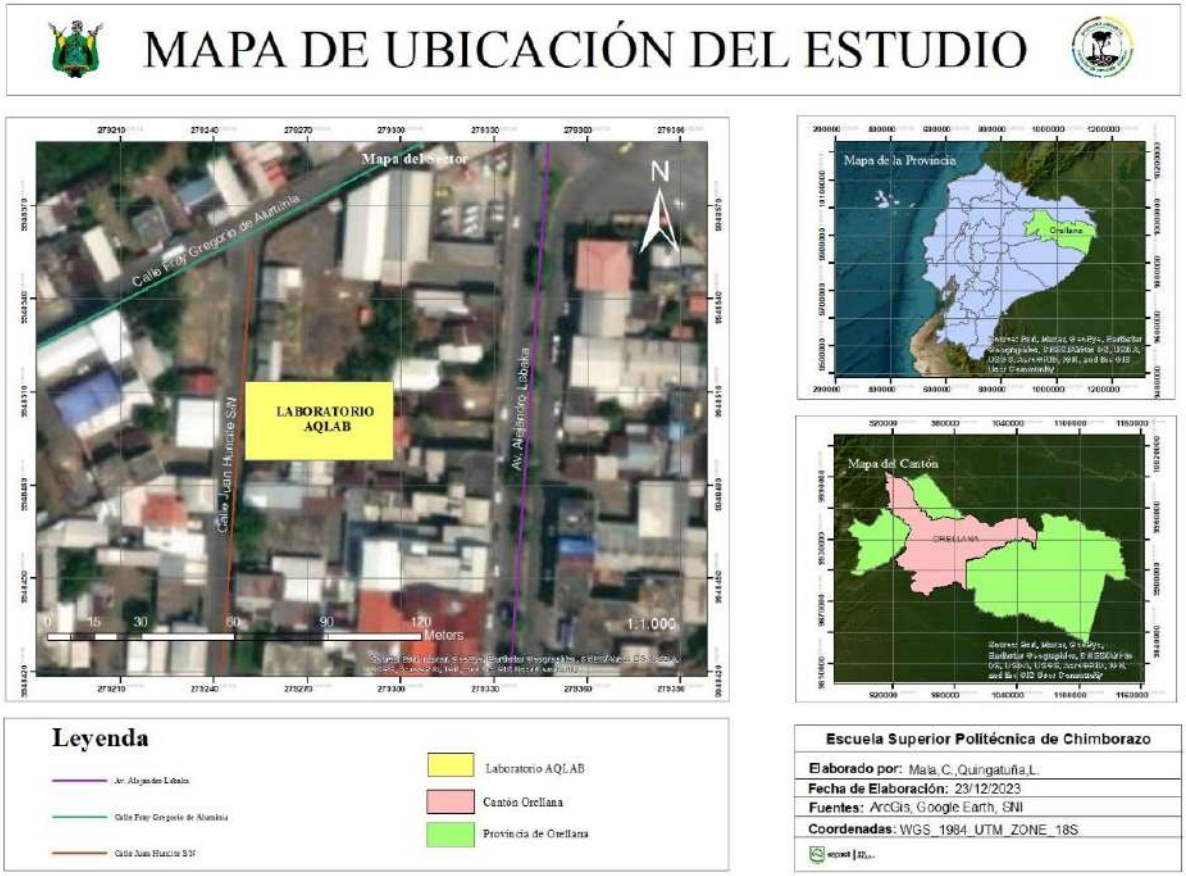


Ilustración 3-1: Mapa de ubicación del estudio

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

3.2 Enfoque de la investigación

El Trabajo de Integración Curricular tiene como finalidad biorremediar suelo contaminado con TPHs, para ello se realizó la bioaumentación de dos especies de bacterias *Pseudomonas*, y se determinó la eficiencia de degradación. Por lo tanto, el trabajo tiene dos enfoques: cualitativo y cuantitativo. Es cualitativo porque se identificó las especies de bacterias nativas capaces de

reducir estos compuestos, se realizó caracterización morfológica, bioquímica y molecular. Y el enforque cuantitativo es la determinación de densidad bacteriana y la concentración de parámetros fisicoquímicos durante el proceso de biorremediación que determinaron la reducción del hidrocarburo presente.

3.3 Alcance de la investigación

El alcance de esta investigación es evaluar la efectividad de la biorremediación con bacterias nativas, en 300 Kg de suelo contaminado. Para ello se identificaron las especies de bacterias presentes haciendo uso de pruebas morfológica (tinción de Gram), bioquímica (oxidasa y catalasa) y molecular (PCR). La bioaumentación, se aplicó en las especies identificadas *P. aeruginosa y* la *P. fluorescens* debido a sus capacidades biodegradadoras, mediante el estándar McFarland 0.5 aproximando una densidad bacteriana de $1X10^8$ UFC/mL. El proceso de bioerremediación se llevó a cabo durante 45 días, en los que se analizaron periódicamente el crecimiento microbiano y los cambios en la concentración del contaminante y finalmente compararlos con los límites permisibles para uso de suelo con la normativa vigente. Los resultados proporcionaron información sobre la viabilidad y la eficacia de las bacterias usando esta técnica, se consideraron limitaciones como las condiciones ambientales y la disponibilidad de recursos para garantizar la validez de los hallazgos.

3.4 Tipo de investigación

Experimental: Se probó cuál de las bacterias aisladas del suelo contaminado es más eficiente removiendo TPHs.
Cualitativa: Se identificó las especies de bacterias en el suelo contaminado, comparando las características morfológicas, bioquímicas y moleculares de las *Pseudomonas* spp.
Cuantitativa: Se determinó la densidad bacteriana y los parámetros fisicoquímicos del suelo como la concentración de TPHs, temperatura, humedad, pH y conductividad eléctrica.

3.5 Diseño de investigación

La biorremediación se realizó en 300 Kg de suelo contaminado con TPHs, provenientes de los desechos del laboratorio AQLAB, para su monitoreo a lo largo del proceso se hicieron determinaciones fisicoquímicas y densidad bacteriana en periodos de 0, 15, 30 y 45 días.

3.5.1 Diseño experimental

Se llevó a cabo un diseño completamente al azar (DCA) donde la variable independiente o factor es el tipo de bacteria. Este factor tiene tres niveles o tratamientos que son: Testigo A (sin masificación), Tratamiento 1 B (uso *P. fluorescens)* y Tratamiento 2 C (uso de *P. aeruginosa)*. En cada tratamiento se realizaron 3 réplicas, por lo que en total se utilizaron 9 unidades experimentales. Los tratamientos se asignaron de manera aleatoria a las unidades experimentales (muestras de suelo). El esquema del diseño experimental se presenta en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1: Diseño completamente al azar

Tratamientos		
Testigo (A)	**Tratamiento 1 (B) ($1x10^8$ UFC/mL)**	**Tratamiento 2 (C) ($1x10^8$ UFC/mL)**
Repetición 1 (R1)	Repetición 1 (T1R1)	Repetición 1 (T2R1)
Repetición 2 (R2)	Repetición 2 (T1R2)	Repetición 2 (T2R2)
Repetición 3 (R3)	Repetición 3 (T1R3)	Repetición 3 (T2R3)

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

En cada unidad experimental se midieron las siguientes variables dependientes o variables de respuesta: TPHs y densidad bacteriana. El análisis estadístico se realizó a un nivel de confianza del 95 % (α =0,05) con el programa paquete estadístico para las ciencias sociales (SPSS). Se efectuó un Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor en donde se probaron las hipótesis.

H0: Todas las medias son iguales
H1: Al menos una media es diferente de las de más

Para decidir si se rechaza o no la hipótesis nula (H0) se siguió la regla del valor p.

- Si valor p < nivel de significancia (α), se rechaza H0
- Si valor p ≥ nivel de significancia (α), no se rechaza H0

3.6 Materiales, instrumentos, reactivos, insumos y preparación de medios de cultivos

En la investigación se utilizó los siguientes materiales, instrumentos, reactivos en insumos de la Tabla 3-2.

Tabla 3-2: Materiales, instrumentos, reactivos e insumos.

Clasificación	Lista
Materiales e instrumentos	• Pipeta automática de 10 mL • Pipeta automática de 1mL • Frascos autoclavable de 100 mL • Frascos autoclavable de 500 mL • Frascos estériles de 100 mL • Tubos de ensayo de 100 mL • Tubos de ensayo de 10 mL • Probeta de 100 mL • Balanza analítica • Desecador • Espátula • Tamiz de 10 mm • Mortero • Embudo • Membrana de filtración • Mechero bunsen • Mechero de alcohol • Asa de platino • Varilla de agitación • Cajas petri desechables estériles • Piza • Portaobjetos • Vaso de poliestireno • pH-metro • Termómetro digital de bolsillo • Conductímetro • Crisoles de porcelana • Papel de aluminio • Bandeja de poliestireno • Papel filtro • Branson ultrasonido • InfraCal TOG/TPH Analyzers • Agitador vortex • Puntas estériles de 1 mL • Puntas estériles de 10 mL

Equipos	• Autoclave • Estufa • Incubadora • Refrigeradora • Sistema de filtración de membrana • Lámpara de UV • Cabina de flujo laminar • Microscopio óptico de campo claro • Espectrofotómetro ultra violeta visible EFQ/014
Reactivos	• Agar cetrimida • Alcohol cetona • Agua de peptona • Agua destilada • Medio de cultivo Infusión Cerebro Corazón (BHI) • Aceite de inmersión • Cristal violeta • Lugol al 1% de concentración • Safranina • Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% • Glicerol • Sulfato de sodio • Sílice gel • Hexano • Tiras reactivas de oxidasa • Estándar McFarland de 0.5
Insumos	• Leche descremada

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

3.6.1 Preparación de mezclas

3.6.1.1 Agar selectivo cetrimida

Se utiliza el agar selectivo cetrimida con la finalidad de inhibir el crecimiento de otros microrganismos, el mismo se preparó de acuerdo con el siguiente proceso:

1. Se añade 23,35 g de agar en 500 mL de agua destilada en un frasco autoclavable de 500 mL, se homogeniza durante 1 minuto.
2. Se lo lleva al autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121 ºC.

3. Después de enfriarse ligeramente se procede a verter aproximadamente 10 mL de este agar en las cajas petri.
4. Por último, se almacena las cajas en una cabina de flujo laminar para mantener un ambiente esterilizado.

3.6.1.2 Conservación de cepas

Los 2 aislados (apartado 3.7.1.2) pasan a ser conservados mediante el método por congelación, a continuación, se describe el procedimiento realizado de manera individual para cada aislado.

1. A 5 tubos de ensayos de 10 mL, se añaden 3 mL de agua de peptona, 3 mL de leche descremada y 0,5 mL de glicerol.
2. Se coloca en el autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121ºC.
3. Utilizando el asa esterilizada se recoge (3 veces) la colonia y se transfiere a los tubos esterilizados que contenía la mezcla de agua, leche y glicerol.
4. Se homogeniza, etiqueta y coloca en el refrigerador a una temperatura de -4ºC (Gutiérrez et al., 2015, págs. 95-101).

3.7 Metodología para el proceso de biorremediación del suelo

3.7.1 Aislamiento de las bacterianas Pseudomonas spp. del suelo contaminado con TPHs utilizando el método de agotamiento por estría para la identificación de las especies.

Para la identificación de las bacterias *Pseudomonas*: Primero se realizó la homogenización del suelo, segundo se tomó una muestra compuesta utilizando el método sistemático de rejilla rectangular, tercero la muestra se usó para el aislamiento bacteriano aplicando la técnica de agotamiento por estrías, cuarto se determinó la presencia de bacterias del género *Pseudomonas* en la muestra realizando pruebas morfológica, bioquímica y una prueba molecular para identificar la especies de *Pseudomonas* existentes.

3.7.1.1 Siembra bacteriana

En 90 mL de agua de peptona se colocó 10 g de la muestra de suelo, se homogenizó durante 1 minuto, obteniendo así la solución madre dilución $1x10^{-1}$ UFC/mL (Nivel A). Luego se tomó 10 mL de la solución madre y se añadieron a un frasco que contenía 90 mL de agua de peptona, agitándolo manualmente durante 1 minuto para obtener una dilución de $1x10^{-2}$ UFC/mL (Nivel B). De esta dilución se tomaron 10 mL y se transfirieron a un frasco con 90 mL de agua de peptona, repitiendo el proceso hasta obtener las diluciones de $1x10^{-5}$ UFC/mL (Nivel C, D y E) Ilustración 3-2 (Muñoz, 2016, págs. 26-27). Una vez realizadas las diluciones se filtran en membranas

de 0.45 um los niveles C y E, se siembran por duplicado en cajas petri con agar cetrimida (apartado 3.6.1) finalmente se incubaron en una temperatura de 35ºC durante 48 horas.

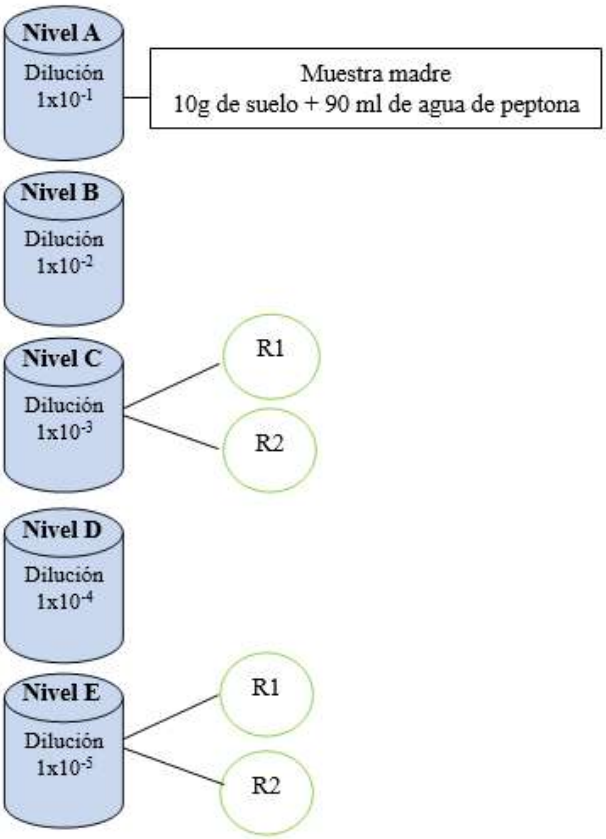


Ilustración 3-2: Método para la siembra de bacterias

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

3.7.1.2 Técnica de aislamiento por agotamiento por estría

Luego de 48 horas de incubación (apartado 3.7.1.1), se usó una lámpara de luz ultra violeta para observar las cepas, con el fin de seleccionar las 2 colonias más representativas para ser estriadas, dado que el género *Pseudomonas* tienden brillar bajo esta luz. Para las colonias elegidas se prepara 2 placas de agar cetrimida (apartado 3.6.1) y se procede a aislar las bacterias, utilizando la técnica de agotamiento por estrías en tres fases como se observa en la Ilustración 3- 3.

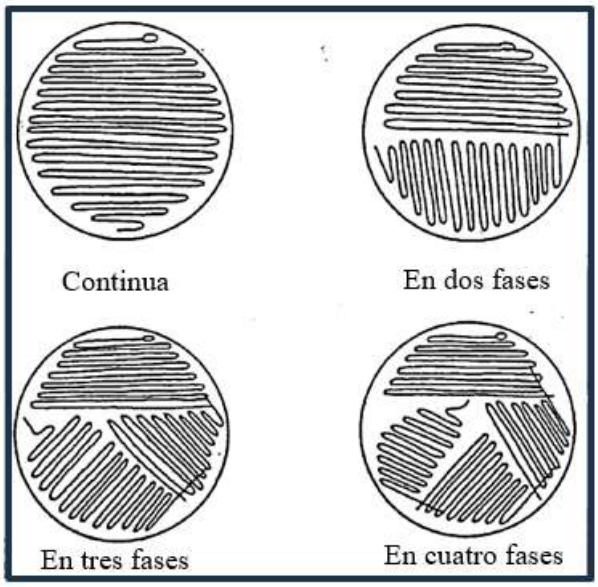


Ilustración 3-3: Técnica de agotamiento por estrías por fases

Fuente: (Sanz, 2011, págs. 20-21)

El procedimiento de la técnica de agotamiento de estría se describe a continuación:

1. Se esterilizó el asa de transferencia en un mechero hasta que estuvo al rojo vivo.
2. Después de dejarla enfriar, se tomó un inóculo de la muestra (apartado 3.7.1.1).
3. El inóculo se transfirió a un área pequeña del agar cetrimida en la caja de petri, cerca del borde.
4. Tras esterilizar nuevamente el asa y dejarla enfriar, se tomó el inóculo obtenido rozando el asa de siembra con las estrías sembradas la primera vez y se realizaron una segunda serie de estrías en una porción virgen de la caja que no tocara la primera serie.
5. Se repite exactamente el proceso del punto 4.
6. Para finalizar se colocaron en la incubadora a una temperatura de 35ºC durante 48 horas (Sanz, 2011, págs. 20-21).
7. Luego de las 48 horas a las colonias aisladas se realizan las pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares (apartado 3.7.1.3).
8. Una vez realizadas las pruebas respectivas se procede a conservar las cepas aisladas mediante el método por congelación (apartado 3.6.1.2).

3.7.1.3 Identificación de las bacterias del género Pseudomonas

A las 2 placas aisladas (apartado 3.7.1.2.) se le realizaron pruebas: morfológica (tinción Gram), bioquímica (oxidasa y catalasa) y molecular (PCR), para la identificación de las bacterias del género de *Pseudomonas*.

- *Caracterización morfológica*

  Se realizó la tinción de Gram, para determinar si la coloración de los aislados (entre rosado y rojizo) pertenecen a las bacterias Gram negativas. Además, se observó en un microscopio con un aumento de 100X. su forma (bacilo) y agrupación (no tiende a agruparse) rasgos distintivos del género *Pseudomonas*. (Reynoso a at., 2024, págs. 241-242). A continuación, los pasos realizados para la tinción de Gram:

  1. Se inició colocando 0.05 mL de agua destilada en el portaobjetos.
  2. Con un asa estéril se tomó una muestra de las colonias incubadas durante 48 horas y se homogenizó la muestra con el agua destilada del portaobjetos.
  3. El portaobjetos se pasa 3 veces por el mechero fijando la muestra.
  4. Se aplicó 0.1 mL de cristal violeta dejando reposar durante 1 minuto, luego se enjuagó con agua destilada.
  5. Se añadió 0.05 mL de Lugol, se esperó por 1 minuto y se enjuagó con agua destilada.
  6. Se añadió 0.1 mL de alcohol cetona esperando unos 30 segundos y se procedió a enjuagar.
  7. Se aplicó 0.1 mL de safranina, se esperó por 30 segundos, se enjuagó, finalmente se dejó secar cerca del mechero (Cevallos y García, 2018, pág. 27).

- *Pruebas bioquímicas*

  Las pruebas bioquímicas como la oxidasa (coloración azul/púrpura) y catalasa (burbujeo) permitieron confirmar la presencia de bacterias del género *Pseudomonas*. A continuación, se detallan los procedimientos para su aplicación.

– ***Oxidasa***

1. Se colocó la tira reactiva en la caja petri.
2. Se humedeció la tira con agua de peptona.
3. Con un asa estéril se tomó una muestra del aislado y se colocó en la tira.
4. El tiempo de respuesta será de 10 a 20 segundos, la presencia de un color azul oscuro nos indicará que la prueba resultó positiva y la ausencia de color un resultado negativo (Reynoso a at., 2024, pág. 751).

– ***Catalasa***

1. Con la ayuda del asa esterilizada se recogió una colonia del aislado y se colocó sobre la caja petri.
2. Se agregó una gota de peróxido de hidrogeno sobre la colonia recogida.
3. Se observó la reacción durante 1 minuto aproximadamente, la formación de burbujas nos da un resultado positivo y por el contrario la ausencia un resultado negativo (Reynoso a at., 2024, pág. 751).

– *Prueba molecular*

Para la prueba molecular se enviaron los 2 aislados al laboratorio especializado (IDGEN). Se aplicó el método molecular Barcoding, con la finalidad de comprobar los hallazgos de las pruebas morfológicas y bioquímicas, para conocer las especies de las bacterias *Pseudomonas* (Anexo C).

3.7.2 Incrementación de población de Pseudomonas spp. mediante una concentración de escala McFarland 0.5, determinando el comportamiento de la densidad bacteriana en el proceso de biorremediación.

Una vez identificadas las especies de *Pseudomonas fluorescens* y *aeruginosa* (apartado 3.7.1.3) y conservadas las 2 cepas aisladas (apartado 3.7.1.2). Para llevar a cabo la bioaumentación se procede a activar las cepas conservadas, luego se realizó la escala McFarland 0.5 adquiriendo una densidad bacteriana de 1X 10^8 UFC/mL, además se construyó 9 cajoneras (unidades experimentales) en las que se dispuso 33.33 Kg de suelo y se dividió en 3 tratamientos con 3 réplicas (Tabla 3-1). Finalmente se inoculó las bacterias en los tratamientos. Para controlar la densidad bacteriana se llevó a cabo el recuento de las colonias durante el proceso de

biorremediación a continuación se detallan los procedimientos implementados en la bioaumentación.

3.7.2.1 Activación de las cepas

A las 2 cepas conservadas previamente (apartado 3.6.1.2) se les activa de manera individual para realizar la bioaumentación, el procedimiento de activación se detalla a continuación.

1. En un frasco autoclavable que contiene 1 000 mL de agua destilada, se agregó 37 g de medio de cultivo BHI.
2. Se llevó al autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121ºC.
3. Posteriormente se ubicó en la cámara de flujo laminar para mantenerlo en un ambiente esterilizado, hasta que esté completamente frío.
4. Con el asa (esterilizada) se recolectó una colonia de las cepas conservadas (3.6.1.2), se colocó en el medio de cultivo.
5. Finalmente, se incubó durante 48 horas a una temperatura de 35ºC (Jiménez, 2018, pág. 29).

3.7.2.2 Preparación del estándar McFarland 0.5

Esta turbidez estándar de 0.5 se la preparó para compararla con la bioaumentación realizada de $1X10^8$ UFC/mL a continuación, se detalla su procedimiento.

1. En un tubo de ensayo con capacidad de 10 mL, se añadió 0.5 mL de la solución de cloruro de bario di-hidratado más 9,5 mL de ácido sulfúrico.
2. Para la comprobación de la exactitud de la densidad de la turbidez, se realizó mediante un espectrofotómetro con un paso de luz de 1cm; para este tipo de turbidez la absorbancia de la longitud de onda es de 625 nm debe ser de 0,08-01.
3. Se selló el tubo con parafilm para evitar la evaporación.
4. Se procedió a guardar en la oscuridad a una temperatura ambiente de 22 a 25 ºC.
5. Antes de utilizar el tubo se debe agitar en el vórtex de manera que esté bien homogenizado (Barrera, 2017, pág. 27).

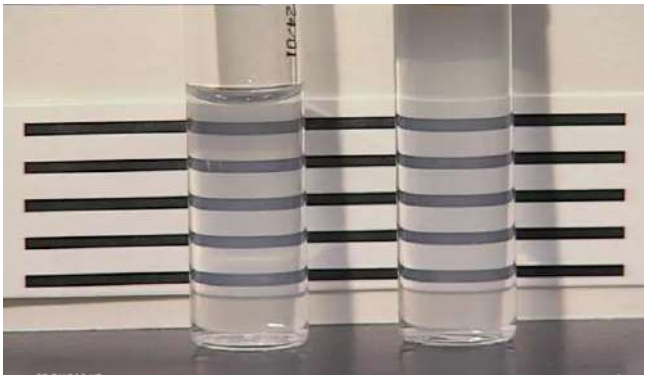


Ilustración 3-4: Estándar McFarland de 0.5

Fuente: (Tankeshwa, 2016, págs. 3-4)

3.7.2.3 Preparación e inoculación de la suspensión bacteriana de $1x10^8$ UFC/mL

Se preparó dos suspensiones de bacterias para *P. fluorescens* y *aeruginosa* que se inocularon al suelo acorde a la Tabla 3-1. La preparación de la suspensión bacteriana se describe a continuación.

1. Utilizando el asa esterilizada se obtuvo una muestra de cada cepa activada (3.7.2.1), esta se colocó en 2 frascos que contenían 500 mL del medio de cultivo BHI (Identificar el frasco con el nombre de cada bacteria).
2. Se llevó a la incubadora durante 48 horas a una temperatura de 35ºC.
3. Se comparó la turbidez de las suspensiones, con la turbidez del estándar McFarland de 0.5.
4. Dado que las suspensiones estaban muy concentradas se procedió a diluirlas colocando 300 mL de agua de peptona en 6 atomizadores esterilizados (3 atomizadores para tratamiento 1 *Pseudomona fluorescens y* 3 para tratamiento 2 *Pseudomona aeruginosa*). A las que se les añadió 30 mL de las suspensiones iniciales.
5. Luego se colocó a las 6 suspensiones (diluidas) con el estándar frente a una luz contra un fondo blanco con rayas negras de contraste.
6. Una vez obtenidas las 3 suspensiones de cada especie bacteriana, se realizó la inoculación en los 2 tratamientos y sus respectivas réplicas (Tabla 3-1).

Nota: si la turbidez es muy alta se puede agregar agua de peptona y si la turbidez es muy baja se le puede colocar más bacterias a la suspensión, se debe ir homogenizando en el caso de añadir agua o bacterias antes de ser comparadas (Tankeshwa, 2016, págs. 3-4).

3.7.2.4 Monitoreos de los parámetros fisicoquímicos

Se implementó un invernadero para llevar a cabo el proceso de biorremediación, manteniendo bajo control los parámetros físicos del suelo como pH, temperatura, conductividad eléctrica y humedad, se aplicó riego de agua y oxigenación al suelo cada dos días, creando así un ambiente óptimo para la multiplicación bacteriana.

- Potencial de hidrógeno (pH)

Para los análisis de pH se realizó con el método EPA 9045D pH del suelo y desechos. A continuación, se puede observar el procedimiento del método aplicado:

1. Mediante la balanza analítica se pesó en un vaso 20 g de suelo.
2. Con una probeta se añadió al vaso 40 mL de agua destilada.
3. Se homogéneo la solución con una varilla de agitación.
4. La muestra se dejó reposar durante unos 30 minutos aproximadamente hasta que se precipitó el suelo.
5. Finalmente, se midió en un pH-metro (EPA, 2004, págs. 1-5).

- *Temperatura*

No se utilizó un método específico para el control de la temperatura, sin embargo, a continuación, se describe el procedimiento empleado.

1. Se insertó el termómetro en el suelo aproximadamente 10 cm de profundidad.
2. Se aseguró de que estuviera nivelado y sin obstrucciones que pudieran afectar la lectura.
3. Se esperó 2 minutos hasta que la lectura se estabilice.

- *Conductividad eléctrica*

Para los análisis de conductividad eléctrica se realizó con el método 9050A. A continuación, se puede observar el procedimiento del método aplicado:

1. Mediante la balanza analítica se pesó en un vaso 20 g de suelo.
2. Con una probeta se añadió al vaso 100 mL de agua destilada.
3. Se homogéneo la solución con una varilla de agitación.
4. La muestra se dejó reposar durante unos 30 minutos aproximadamente hasta que se precipitó el suelo.
5. Finalmente, se midió en un conductímetro (EPA, 1996, págs. 1-5).

- *Humedad*

Para determinar la humedad del suelo se utilizó el método gravimétrico, el mismo que se detalla a continuación:

1. En la estufa se colocaron los crisoles durante 4 horas a una temperatura de 105 ºC con la finalidad de eliminar la humedad presente.
2. Se dejaron reposar en el desecador durante media hora.
3. Se pesó en la balanza analítica los crisoles vacíos y se agregaron aproximadamente 5 g de muestra de suelo.
4. Para evitar la pérdida de humedad, los crisoles se cubrieron con papel aluminio y se realizaron pequeñas aberturas para permitir la evaporación.
5. Los crisoles fueron llevados nuevamente a la estufa y se mantuvieron durante 24 horas a una temperatura de 105 ºC.
6. Finalmente, se volvió a medir el peso de los crisoles y se aplicó la ecuación 2 para conocer el porcentaje de humedad (Licta, 2020, págs. 1-6).

Ecuación 2: Porcentaje de humedad

$$\%Humedad = \frac{(Peso\ de\ la\ muestra\ húmeda - Peso\ de\ la\ muestra\ seca)}{Peso\ de\ la\ muestra\ húmeda}$$

3.7.2.5 Siembra y recuento de las colonias

El recuento de colonias se realizó antes de inocular las bacterias y durante el proceso de biorremediación.

1. Para el recuento de las bacterias en el suelo se utilizó el procedimiento descrito en el apartado (3.7.1.1).
2. Luego de las 48 horas se procedió contar el número de colonias presentes utilizando la Ecuación 1 y así determinar el número de bacterias en Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) (Sanz, 2011, págs. 20-21).

Nota: La dilución sembrada que se contabilizará será acorde al grado de contaminación del suelo que se va a utilizar, en este caso se contabilizó la dilución 3 y 5 siendo la 3 la que mejor conteo tuvo entre 25 y 300 colonias por caja petri.

Ecuación 1: Número de colonias

$$\boldsymbol{N^{\underline{o}}bacterias} = N^{\underline{o}}\ colonias * cantidad\ de\ muestra\ (volumen) * factor\ de\ dilución$$

3.7.3 Evaluación de la eficiencia de Pseudomonas spp. determinando el porcentaje de remoción de TPHs, comparando con los límites establecidos en la normativa.

Se determinaron las concentraciones y el porcentaje de remoción de los TPHs, con la finalidad de compararlos con los estándares establecidos por la normativa ambiental vigente (Tabla 2-7).

3.7.3.1 Hidrocarburos totales de petróleo (TPHs)

Se utilizó el método estandarizado para asegurar la precisión y fiabilidad de los resultados obtenidos de TPHs: Método 1664 por extracción con hexano y espectrometría infrarrojo. A continuación, se detallada el procedimiento:

1. Se colocó 0.5 Kg de suelo en una bandeja cubierta con papel aluminio y se dejó secar a temperatura ambiente.
2. Una vez el suelo estuvo completamente seco se lo trituró con el mortero para después tamizarlo.
3. Utilizando la balanza analítica en un tubo de ensayo de 100 mL se pesaron 2 g del suelo, adicionalmente se le añadieron 0.5 g de sulfato de sodio, 0.3 g de sílice gel y 10 mL de hexano.
4. El tubo se llevó al ultrasonido durante 15 minutos para homogeneizarlo.
5. Se filtró la muestra en otro tubo de ensayo de 10 mL utilizando un embudo y papel filtro.
6. Con una jeringa 1 mL, se tomó 0.1 mL de muestra y se midió el nivel de concentración de TPHs en el InfraCal.
7. Por último, se aplicó la ecuación del laboratorio obteniendo la concentración de TPHs y para el porcentaje de remoción la ecuación 3 (EPA, 2010, págs. 1-30; EPA, 2007, págs. 1-17).

Ecuación 3: Porcentaje de remoción de TPHs

$$Remoción\ \% = \frac{(Valor\ inicial\ -\ Valor\ final)}{Valor\ final} * 100$$

CAPÍTULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Resultados

4.1.1 Resultados del aislamiento de las bacterias Pseudomonas spp del suelo contaminado con hidrocarburos utilizando el método de agotamiento por estrías para la identificación de las especies.

Los resultados obtenidos de la tinción de Gram son positivos para bacterias Gram negativas, así mismo se evidencia la forma y tipo de agrupación de estas bacterias (Ilustraciones 4-1 y 4-2). Respecto a la prueba de oxidasa (Ilustraciones 4-3 y 4-4) y catalasa (Ilustraciones 4-5 y 4-6) como se observa en las Ilustraciones sus resultados fueron positivos reafirmando presencia del género *Pseudomonas*.

En los cultivos bacterianos enviados al laboratorio IDGEN, se logró identificar dos especies del género *Pseudomonas*; *Pseudomona fluorescens y Pseudomona aeruginosa*. Los resultados obtenidos de las pruebas se evidencian en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1: Resultado de las pruebas para identificación de *Pseudomonas* nativas

Morfológica			**Bioquímica**			**Molecular**		
	Aislado 1	Aislado 2		Aislado 1	Aislado 2		Aislado 1	Aislado 2
Color (Gram negativo)	+	+	Oxidasa	+	+	PCR	*Fluorescens 100%*	*Aeruginosa 99.9%*
Forma (bacilo)	+	+	Catalasa	+	+			

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

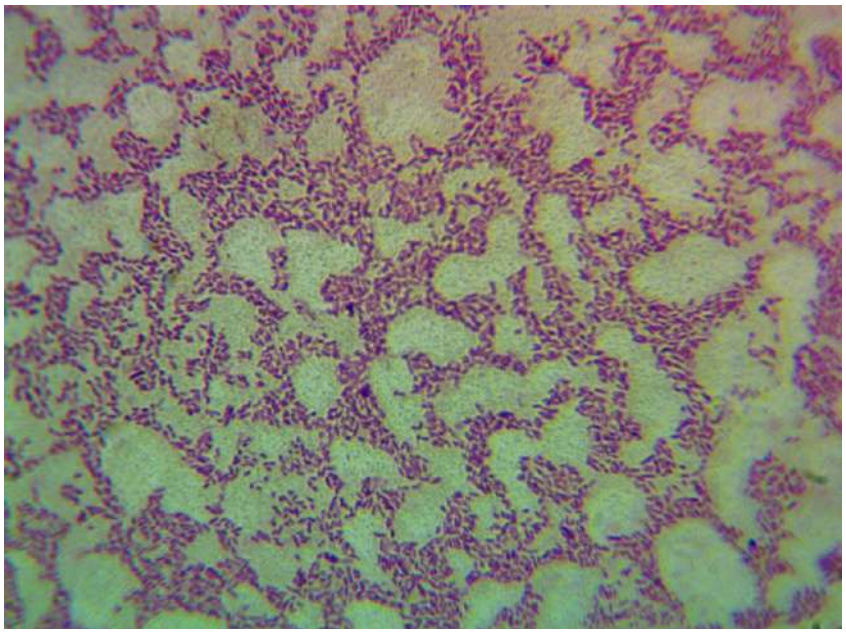


Ilustración 4-1: Caracterización microscópica de aislado 1

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

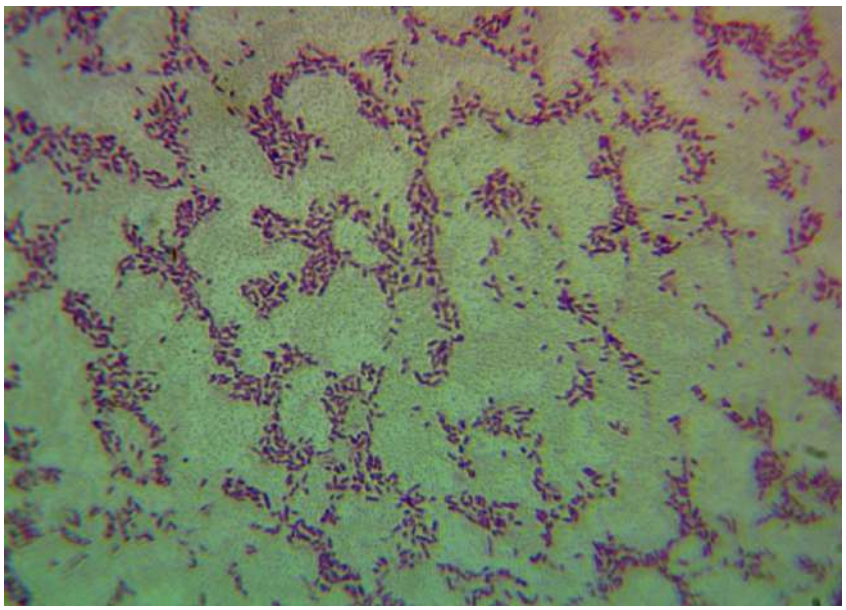


Ilustración 4-2: Caracterización microscópica aislado 2

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

– **Oxidasa**

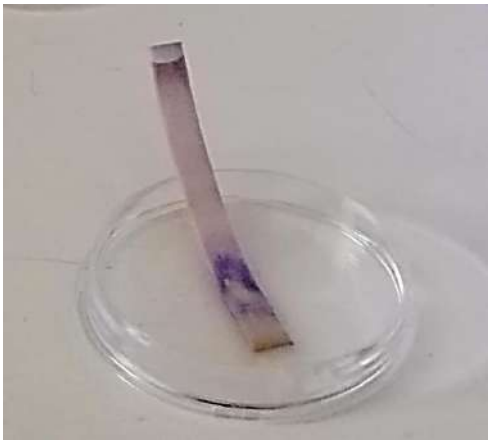


Ilustración 4-3: Prueba de oxidasa aislado 1

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

Ilustración 4-4: Prueba de oxidasa aislado 2

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

– **Catalasa**

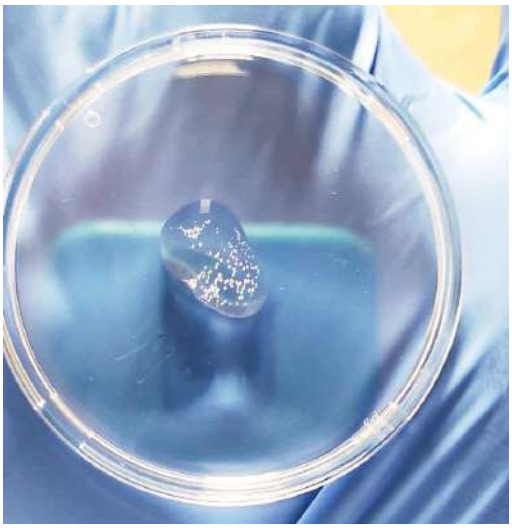


Ilustración 4-5: Prueba de catalasa aislado 1

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

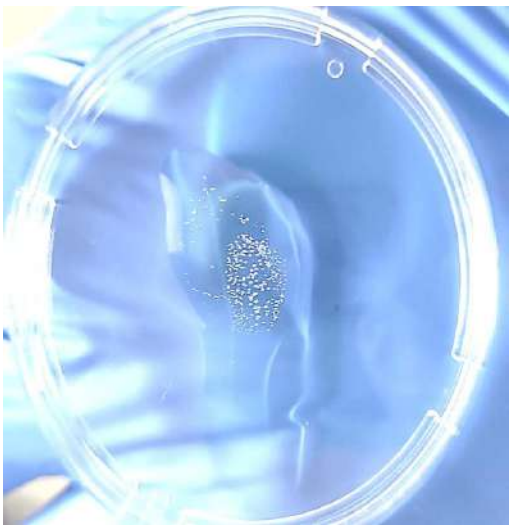


Ilustración 4-6: Prueba de catalasa de la aislado 2

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

– **Prueba molecular**

Tabla 4-2: Resultado de la prueba molecular.

Código IDgen	Código original	Longitud	% de Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	Nº Accesión
B667c	Muestra 1, Dilución S, Fco. de Orellana	1390	94,4	*Pseudomona aeruginosa*	16S	99,9	MT646431.1
B667d	Muestra 1, Dilución S, Fco. de Orellana	1230	93,9	*Pseudomona fluorescens*	16S	100	MG461471.1

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

4.1.2 Resultados de la incrementación de población de Pseudomonas spp. mediante una concentración de escala McFarland 0.5, determinando el comportamiento de la densidad bacteriana en el proceso de biorremediación.

De las 6 suspensiones obtenidas con escala de turbidez de McFarland de 0,5 (apartado 3.7.2.3), se llevó un monitoreo periódico para conocer el crecimiento microbiano durante el proceso de biorremediación (Anexo D) los datos de los monitoreos se los promedió para realizar el respectivo análisis estadístico.

En la Tabla 4-3, se registran valores iniciales y finales de la densidad bacteriana en los tratamientos, por lo que se evidencia que a media que el tiempo transcurre la concentración de microrganismo va en aumento. Además, se puede observar una menor concentración de bacterias en el tratamiento A en comparación del conteo final al día 45 de los tratamientos B y C, esto se principalmente a que en estos tratamientos se dio la bioaumentación.

Tabla 4-3: Densidad bacteriana de los Tratamientos

Densidad bacteriana			
Tiempo (días)	**Tratamientos**		
	A UFC/mL	B UFC/mL	C UFC/mL
0	5,60E+06	1,06E+08	1,06E+08
15	6,78E+06	4,38E+08	4,23E+09
30	1,57E+07	5,57E+10	9,00E+11
45	1,82E+07	5,53E+10	9,37E+11

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

Durante los primeros 15 días, se observó que las bacterias estaban en una fase de adaptación dado que no se evidencia un crecimiento considerable. Sin embargo, al rededor del día 30, se notó un aumento significativo en el crecimiento, lo que sugiere una fase de crecimiento exponencial. Finalmente, en el día 45 las bacterias alcanzaron una fase estacionaria, ya que no se observó un crecimiento significativo y no se registró una fase de muerte. El tratamiento C mostró la mayor densidad bacteriana, con un valor de $3{,}37X^{11}$UFC/mL como se muestra en la Ilustración 4-7.

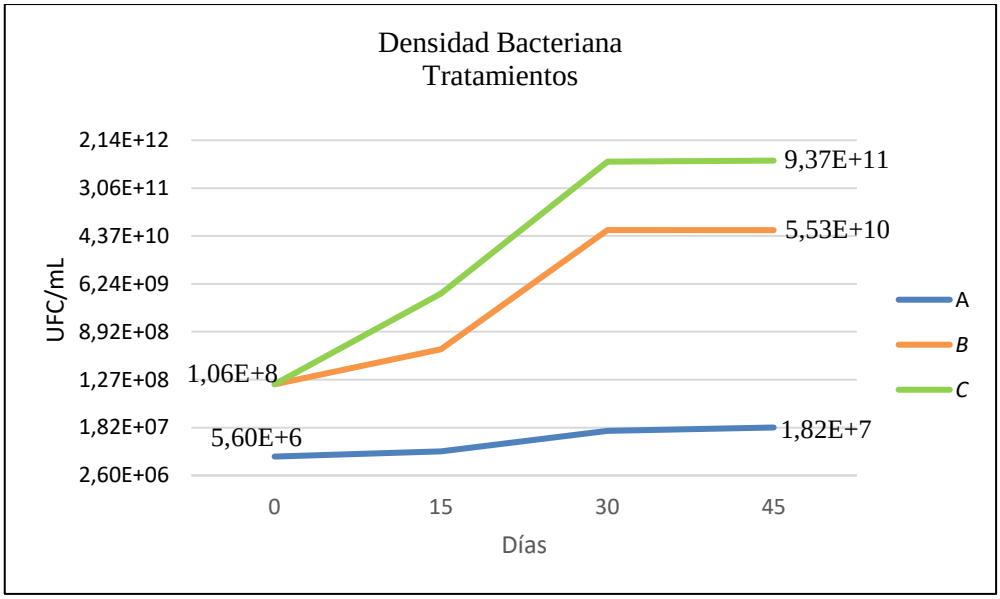


Ilustración 4-7: Densidad Bacteriana de los tratamientos

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

Se realizó un ANOVA de la densidad bacteriana con los datos a los 45 días a un nivel de confianza del 95 % (α = 0,05). En el ANOVA se observa que el p-valor es menor a 0,05, por lo que se rechaza la H0 de igualdad de medias y se concluye que la biaumentación influye en la densidad bacteriana de los tratamientos (Tabla 4-4).

Tabla 4-4: ANOVA de la densidad bacteriana de los tratamientos

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F. V	**SC**	**gl**	**CM**	**F**	**p-valor**
Modelo	1,65590685899339E24	2	8,27953429496694E23	44,13	0,0003
Tratamientos	1,65590685899339E24	2	8,27953429496694E23	44,13	0,0003
Error	1,125693333345E23	6	1,876155555575E22	-	-
Total	1,76847619232789E24	8	-	-	-

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

Lo anterior se confirma con una prueba de Tukey en donde el A y el tratamiento B son estadísticamente iguales ya que tienen la misma letra. Estos tratamientos presentan los valores más bajos en la densidad bacteriana. Por otro lado, el tratamiento C es estadísticamente diferente del resto y presenta los valores más altos en la densidad bacteriana. Como se observa en la Tabla 4-5.

Tabla 4-5: Prueba de Tukey de la densidad bacteriana de los tratamientos

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=343149201979,56653			
Error: 1,8761555555750022E0022 gl=6			
Tratamientos	**Medias**	**N**	**E. E**
A	18166666,67	3	79081299002,46 A
B	55333333333,33	3	79081299002,46 A
C	936333333333,33	3	79081299002,46 B
Medias con letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)			

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

4.1.3 Resultados de la evaluación de la eficiencia spp. determinando el porcentaje de remoción de TPHs, comparándolos con los límites establecidos en la normativa

Se recopiló datos numéricos de los TPHs en los tratamientos (A, B y C), en el periodo de 0, 15, 30 y 45 días que duró la biorremediación.

4.1.3.1 Remoción de TPHs en los tratamientos

Los tratamientos al inicio de la biorremediación presentaron el valor de 4404,3 mg/kg conforme avanzaba el tiempo la concentración de TPHs fue disminuyendo hasta llegar a 942,5 mg/kg en el tratamiento A, el tratamiento B fue de 456,7 mg/kg y el tratamiento C fue de 246,2 mg/kg, en la Tabla 4-6 se muestras los valores obtenidos por tratamientos a lo largo del proceso de biorremediación.

Tabla 4-6: Resultado de la remoción de TPHs en los tratamientos

Hidrocarburos totales de petróleo (mg/Kg)			
Tiempo (días)	Tratamientos		
	A	B	C
0	4404,3	4404,3	4404,3
15	3085,8	2706,0	2474,9
30	1617,8	1008,1	728,9
45	942,5	456,7	246,2

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

Los 3 tratamiento fueron comparados con los valores máximos permisibles en suelo según sus usos establecidos en la normativa vigente (tabla 2-7), aquellos tratamientos donde se aplicó la bioaumentación lograron cumplir con los límites permisibles para uso comercial e industrial (Ilustración 4-8).

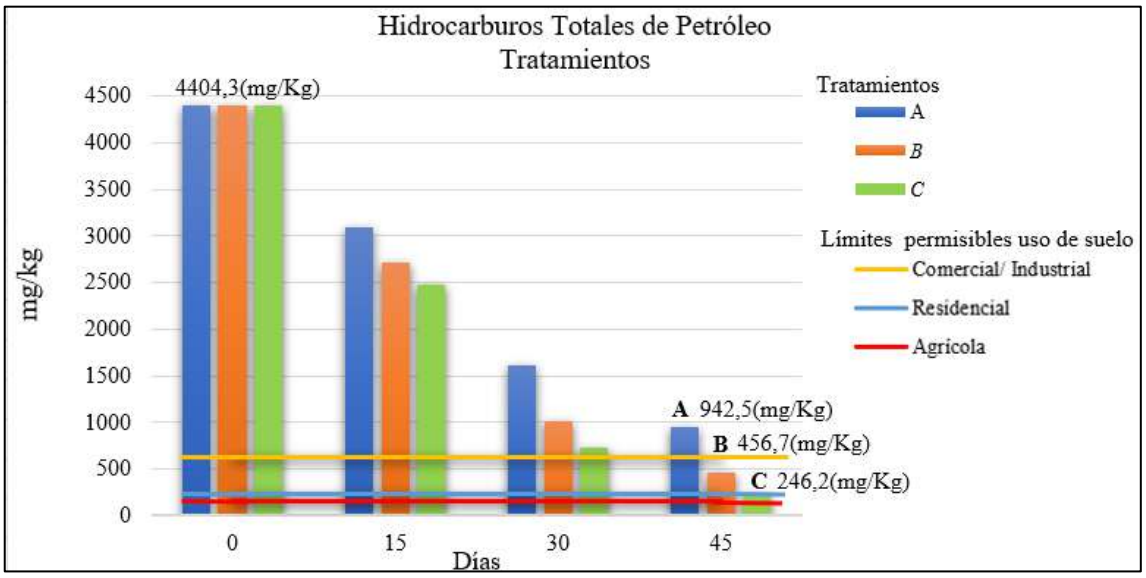


Ilustración 4-8: Remoción de THP de los tratamientos

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

Se realizó un ANOVA de TPHs con los datos a los 45 días a un nivel de confianza del 95 % (α = 0,05). En el ANOVA se observa que el p-valor es menor a 0,05, por lo que se rechaza la H0 de igualdad de medias y se concluye que los tratamientos sí influyen en los valores de los TPHs (Tabla 4-7).

Tabla 4-7: ANOVA de TPHs.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F. V	**SC**	**gl**	**CM**	**F**	**p-valor**
Modelo	765303,20	2	382651,60	82,35	<0,0001
Tratamiento	765303,20	2	382651,60	83,35	<0,0001
Error	27880,26	6	4646,71	-	-
Total	793183,46	8	-	-	-

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

Lo anterior se confirma con una prueba de Tukey en donde el tratamiento A y los tratamientos B y C son estadísticamente diferentes ya que tienen diferentes letras (Tabla 4-8).

Tabla 4-8: Prueba de Tukey de TPHs

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=170,77384			
Error: 4646,7100 gl=6			
Tratamientos	**Medias**	**n**	**E. E**
A	942,53	3	39,36 A
B	456,67	3	39,36 B
C	246,17	3	39,36 C
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)			

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

El porcentaje de remoción de cada tratamiento durante el proceso de biorremediación se evidencia en la Tabla 4-9, presentando los siguientes resultados: el tratamiento del A 78,6%, el tratamiento B con 89,6% y el tratamiento C con 94,4%.

Tabla 4-9: Porcentaje de remoción de TPH en los tratamientos

Hidrocarburos totales de petróleo (mg/Kg)			
Tratamientos	**Concentración inicial**	**Concentración final**	**% de remoción**
A	4404,3	942,5	78,6
B	4404,3	456,7	89,6
C	4404,3	246,2	94,4

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

4.2 Discusión

Identificar *Pseudomonas* nativas, en las pruebas realizada a los aislados se obtuvo lo siguiente: prueba morfológica (tinción de Gram) una coloración rosada/roja y la forma de bacilo, en las pruebas bioquímicas (oxidasa) se evidenció una coloración azul, (catalasa) la presencia de burbujeo y en la prueba molecular los aislados presentaron el fragmento 16S evidenciando la presencia *de Pseudomonas aeruginosa y fluorescens*. De acuerdo a Gómez Ambar y Véliz Angie (2023) al exponer a la coloración de Gram y la prueba de oxidasa a 64 cepas con aparente identificación de *Pseudomona*s spp., luego de ser expuestas obtuvieron que el 73.4% (47/64) de los viales correspondían a *Pseudomonas* spp. (Gómez y Véliz, 2023, págs. 32-36). Así también Puma Erika y Palomino Kevin (2019) mencionan que la enzima de catalasa está presente en el género de *Pseudomona*s, por lo que al realizar la prueba de catalasa y esta desprenda burbujas indica que es positiva es por esto que al realizar la prueba de catalasa a 16 colonias de *Pseudomona*s sp. 13 de ellas dieron positivo (Puma, y Palomino, 2019, págs. 18-20), En tanto el análisis molecular para diferenciar *Pseudomonas* usando el método de comparación secuencial del 16S rRNA que es tribuido a las *P. aeruginosa, P. fluorescens* y otras especies de este género (Ruiz, 2007, págs. 2-16). Estos resultados concuerdan con lo encontrado en esta investigación ya que de esta manera se corrobora la existencia de *Pseudomonas* nativas en el suelo sujeto de estudio.

Al incrementar la población de *Pseudomonas spp*., en los tratamientos B y C haciendo uso de la escala McFarland de 0,5 con una concentración de (1.5 x 10^8UFC/mL), durante el proceso de biorremediación se evidencia un incremento mayor en la densidad bacteriana a los 45 días en los tratamientos inoculados (Tratamiento B=5,53E+10) y (Tratamiento C= 9,37E+11) en comparación con el tratamiento A que no fue inoculado (A=1,82E+07). De acuerdo a Fiestas Cecilia y Vásquez Walter 2020 utilizar la bioaumentación como proceso biorremediador se espera obtener resultados en un menor tiempo al incrementar la biomasa bacteriana, cultivando microrganismos nativos o exógenos degradadores en un laboratorio que serán inoculados para el proceso de biodegradación (Fiestas y Vásquez, 2020, pág. 10). De manera similar los datos obtenidos de Acosta, Toledo y otros (2021) al aplicar la escala McFarland en bacterias hidrocarburoclásticas luego de 21 días se mostró un incremento bacteriano de 10^6 a 10^8 UFC/mL (Acosta et al., 2021, pág. 82). Lo que reafirma que al usar la escala McFarland la densidad bacteriana se mantiene por encima del tratamiento no inoculado durante el proceso de bioaumentación.

Evaluar la eficiencia spp, en los TPHs se evidenció una mayor degradabilidad a medida que la densidad bacteriana incrementaba, por lo que al finalizar el tiempo de biodegradación los tratamientos presentaron un porcentaje de remoción de TPHs considerable (tratamiento

A=78,6%), (Tratamiento B= 89,6%) y (Tratamiento C= 94,4%) en el proceso de biorremediación. De acuerdo a Valenzuela, Galindo, Mantilla y otros (2021) La bioaumentación es una de las técnicas de biorremediación más empleadas en suelos contaminado con hidrocarburos ya que 34 artículos científicos estudiados el porcentaje de aplicabilidad de la bioaumentación es del 44%, seguido de la bioestimulación con 26% (Valenzuela et al., 2021, pág. 111). Paralelamente de 50 estudios entre artículos y tesis analizados por Fiestas y Vásquez el 72% (36 documentos) emplearon *Pseudomonas Aeuriginosa* seguidamente de las *Pseudomonas fluorescens* con el 6% (3 documentos) al igual que la *P. Putida* con el 6% (3 documentos) (Fiestas y Vásquez, 2020, pág. 27). En el trabajo realizado por Ricse y Solis (2021) en 3 periodos de 10 días, demostró una eficiencia de remoción en el suelo contaminado con TPHs del 82.9% al utilizar P. fluorescens (Ricse y Solis, 2021, pág. 106), lo que da validez a nuestro tratamiento 1 en el que se removió 89,6% de los TPHs en un periodo de 45 días reafirmando la capacidad de degradar hidrocarburos de esta especie.

4.3 Comprobación de la pregunta

Los resultados obtenidos indican de manera concluyente que dichas bacterias poseen la capacidad biodegradativa necesaria para descomponer y metabolizar los hidrocarburos presentes en el suelo afectado. La eficacia de la biorremediación se evidenció mediante la observación y cuantificación de la reducción de los niveles de TPHs en el suelo tratado. La identificación y caracterización previa de las cepas de *Pseudomonas* spp. permitió un abordaje específico y direccionado, maximizando la eficiencia del proceso de biorremediación.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El método más efectivo para la identificación de bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* reside en la aplicación de pruebas moleculares, estas pruebas ofrecen un enfoque altamente específico que permite la diferenciación y clasificación precisa de las especies dentro del género. Estas pruebas brindan una resolución más precisa en comparación con las pruebas morfológicas y bioquímicas.

Las bacterias aisladas del suelo contaminado demostraron una notable capacidad de adaptación al entorno. A lo largo del experimento, observamos tres fases distintas en su densidad bacteriana. En primer lugar, se produjo una fase de adaptación, durante la cual las bacterias se ajustaron a las condiciones del suelo. Luego, experimentaron un crecimiento exponencial, multiplicándose rápidamente. Finalmente, llegaron a una fase estacionaria, donde su densidad se estabilizó.

Se observó una diferencia importante en la capacidad de remoción de TPHs entre los tratamientos B con 456,7mg/Kg (89,6%) y tratamiento C con 246,2mg/Kg (94,4%). Ambos tuvieron una reducción significativa en los niveles de TPHs en comparación con el tratamiento A que obtuvo el 942,5 mg/Kg (78,6%), donde la remoción de los hidrocarburos fue notablemente más lenta. Específicamente, se evidenció que tanto *Pseudomonas fluorescens* (tratamiento B) como *Pseudomonas aeruginosa* (tratamiento C) fueron eficaces en la disminución adecuada de los niveles de TPHs, además la comparación entre el porcentaje de remoción de TPHs entre las dos cepas indica que, aunque ambas son eficientes puede existir una variabilidad en su efectividad relativa. Los tratamientos B y C cumplieron con los limites permisibles para uso comercial e industrial que es de 620 mg/Kg, mientras que el tratamiento A no alcanzó con ningún estos límites.

5.2 Recomendaciones

Se aconseja aislar los microorganismos en diferentes medios de agar para identificar otras especies nativas del suelo capaces de degradar los TPHs y fomentar la descontaminación del suelo.

Se propone la utilización de diferentes escalas McFarland para establecer las concentraciones óptimas en las que las bacterias degradadoras logran maximizar su eficiencia en períodos de tiempo más reducidos. Además, se recomienda llevar a cabo controles más frecuentes y durante un tiempo prolongado para poder observar de manera integral el comportamiento de las bacterias.

Se recomienda extender el tiempo de la biorremediación para asegurar que el porcentaje de TPHs en los tratamientos alcance todos los límites permisibles establecidos por la normativa ambiental. Esta extensión del tiempo permitirá que las bacterias degradadoras tengan suficiente oportunidad para actuar de manera efectiva, garantizando una remediación más completa y cumpliendo con los estándares ambientales requeridos para la calidad del suelo.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ACOSTA, Silvia; et al.** "Evaluación de la capacidad hidrocarburoclastica de un consorcio bacteriano aislado de zonas costeras de cuba". *Revista CENIC Ciencias Químicas* [en línea], 2021, (Cuba), vol. 52 (2), págs. 79-88. [Consulta: 10 febrero 2024]. ISSN 2221-2442. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2221-24422021000200079&script=sci_arttext

2. **ACUÑA, Adrián Javier; et al.** "Efecto de la textura de los suelos de la Patagonia sobre el proceso de biodegradación de hidrocarburos". *Researchgate* [en línea], 2010, (Argentina), vol. 104, págs. 73-77. [Consulta: 04 diciembre 2023]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/344389068_Efecto_de_la_textura_de_los_suelos_de_la_Patagonia_sobre_el_proceso_de_biodegradacion_de_hidrocarburos

3. **ALAVA, Jean & RUGEL, Christian.** Análisis de la contaminación Térmica, del suelo y visual producidas por Actividades Petroleras en la Región Americana [en línea]. (Trabajo de titulación). (maestría). Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil – Ecuador. 2021. pág. 20. [Consulta: 2023-11-19]. Disponible enen: https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/52286/1/T-70600%20ALAVA%20-%20RUGEL.pdf

4. **ALFARO, Arístides & DENYER, Percy.** "El petróleo en el Caribe de Costa Rica: historia, actividades exploratorias e intrigas políticas". *Revista Geológica de América Central* [en línea], 2021, (Costa Rica), (65), págs. 87-141. [Consulta: 19 junio 2023]. ISSN 0256-7024. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0256-70242021000200087&lng=en&nrm=iso

5. **ARELLANO, Pablo; et al.** "Detectando los efectos de la contaminación por hidrocarburos en la selva amazónica mediante imágenes satelitales hiperespectrales". *Environmental Pollution* [en linea], 2015, (Ecuador), vol. 205, págs. 225-239. [Consulta: 29 noviembre 2023]. ISSN 0269-7491. Disponoble en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749115002754

6. **BANCO, Central del Ecuador.** *Análisis del sector petrolero*. [blog]. Quito: 27 de febreo, 2023. [Consulta: 15 julio 2023]. Disponible en: https://contenido.bce.fin.ec/documentos/Estadisticas/Hidrocarburos/ASP202204.pdf

7. **BANCO, Mundial.** *Datos del Banco Mundial sobre los precios de las materias primas (The Pink Sheet)*. [blog]. Washington, DC.: 6 de julio, 2023. [Consulta: 15 julio 2023]. Disponible en: https://thedocs.worldbank.org/en/doc/5d903e848db1d1b83e0ec8f744e55570-0350012021/related/CMO-Pink-Sheet-July-2023.pdf.

8. **BARRERA MAYORGA, Ana Karina.** Determinación de la actividad fotoprotectora in vitro DE Zea mays. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba. 2017. pág .27. [Consulta: 2024-03-07]. Disponible en: http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/6838

9. **BENAVIDES, Joaquin; et al.** "Bioremediación de suelos contaminados conhidrocarburos derivados del petróleo". *NOVA* [en línea], 2006, (Colombia), vol. 4 (5), págs. 82-90. [Consulta: 10 enero 2024]. ISSN 1794-2470. Disponible en: https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/351/1203

10. **BIENES, Ramón & MARQUES, María**. " Contaminación de suelos agraria difusa". *Researchgate* [en línea], 2017, (España). vol.1(1), págs. 1-4. [Consulta: 19 noviembre 2023]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/320880845

11. **BOU, Germán; et al.** "Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica". *El sevier* [en línea], 2011, (España), vol. 29(8), págs. 601-608. [Consulta: 10 marzo 2023]. Disponible en: https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-metodos-identificacion-bacteriana-el-laboratorio-S0213005X11001571

12. **CAVAZOS, Judith; et al.** "Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México". *agric. soc. desarro* [en línea], 2014, (México), vol. 11 (4), págs. 539-550. [Consulta: 04 noviembre 2023]. ISSN 1870-5472. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-54722014000400006

13. **CANDO RODRÍGUEZ, Miguel Ángel.** Determinación y análisis de un proceso de bioromediación de suelos contaminados por hidrocarburos. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad Politécnica Salesiana Sede-Cuenca. Cuenca-Ecuador. 2011. pág. 87. [Consulta: 2023-12-11]. Disponible en: https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1520/11/UPS-CT002143.pdf

14. **CAICEDO ROSERO, L.C. et al**. "Medición de humedad en suelos: Revisión de métodos y características". *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*. [en línea], 2021, (México), vol. 9(17), págs. 1-8. [Consulta: 08 diciembre 2023]. ISSN: 2007-6363. Disponible en: https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/icbi/article/view/7035/8022

15. **CAREY, Francis & GIULIANO, Robert.** Química inorgánica. 9na. Impreso en México : Mc Graw Hill education, 2014. ISBN 978-607-15-1210-9, págs. 80-90.

16. **CEPLAN.** "Análisis de la vulnerabilidad ante peligros en zonas costeras y de valles a nivel nacional y el impacto a nivel regional". *Centro Nacional de Planeamiento Estratégico* [en línea], 2023, (Perú), vol. 1 (1), págs. 24-27 [Consulta: 08 enero 2024]. Disponible en: https://geo.ceplan.gob.pe/uploads/Analisis_vulnerabilidad_peligros_zonas_costeras.pdf

17. **CEVALLOS PAGUAY, Tanya Carolina & GARCÍA DÍAZ, Jonathan Darío.** Evaluación de la biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando A*spergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa*. [En líniea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. Quito-Ecuador. 2018. págs. 14-27. [Consulta: 2023-12-25]. Disponible en: https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15681/1/UPS-QT12819.pdf

18. **CHAIRES MARTÍNEZ, Leandro; et al.** I*nvestigación en el Sistema de Educación Superior Tecnológica del Estado de Veracruz* [en línea]. Veracruz-México: Casa Editorial, 2018. [Consulta: 15 enero 2024]. Disponible en: https://www.collegesidekick.com/study-docs/15075235

19. **CHITIVA TORRES, Lina Marcela.** Estudio de procesos de fitorremediación aplicados en suelos contaminados con hidrocarburos por el desarrollo de actividades de las EDS. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad Antonio Nariño, Ingeniería Ambiental y Civil . Bogotá-Colombia. 2021. pág. 7. [Consulta: 2023-12-4]. Disponible en:

https://repositorio.uan.edu.co/server/api/core/bitstreams/5376aac5-1075-45fe-bc70-fbe3b2b22cc1/content

20. **CLARRIDGE, Jill E.** "Impacto del análisis de la secuencia del gen ARNr 16S para la identificación de bacterias en la microbiología clínica y las enfermedades infecciosas". *Clinical Microbiology Reviews* [en línea], 2004, (Estados Unidos), vol. 17(4), págs. 5-8. [Consulta: 10 marzo 2024]. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15489351/

21. **COA**. *Código Orgánico del Ambiente (COA)*. [blog]. Ecuador, 2020. [Consulta: 5 marzo 2024]. Disponible en: https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/01/CODIGO_ORGANICO_AMBIENTE.pdf

22. **CRUZ APUNTE, Jonathan David & LICANGO TUQUERRES, Jonathan Rafael.** Evaluación del proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos totales de petróleo utilizando *trichoderma* sp. y *bacillus pumilu*s, mediante el sistema de biopilas a escala de laboratorio. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. Quito. 2021. págs. 1-6. [Consulta: 2023-12-20]. Disponible en: https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/19882#:~:text=El%20objetivo%20principal%20de%20esta%20investigaci%C3%B3n%20fue%20evaluar,de%20biopilas%20con%20Trichoderma%20sp.%20y%20Bacillus%20pumilus.

23. **DELGADO VELLOSILLO, Irene.** Obtención de bioetanol mediante procesos de fermentación con levaduras: revisión bibliográfica. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad de Zaragoza, Ciencias. Zaragoza-España. 2020. pág. 6. [Consulta: 2024-01-04]. Disponible en: https://zaguan.unizar.es/record/97964/files/TAZ-TFG-2020-3237.pdf?version=1

24. **DELGADO VELASCO, Santiago Fernando & NARVÁEZ CURILLO, Alexander Augusto.** Análisis estadístico de indicadores de rendimiento para servicios de perforación en los últimos 5 años en el Ecuador. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad Central del Ecuador, Ingeniería en geología, minas, petróleos y ambiental. Quito-Ecuador. 2020. pág. 7. [Consulta: 2023-07-27]. Disponible en: http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/22762

25. **EPA.** *Método 1664: Revision B: n-Hexane Extractable Material (HEM; Oil and Grease) and Silica Gel Treated n-Hexane Extractable Material (SGT-HEM; Non-polar Material) by*

Extraction and Gravimetry. [En línea]. EPA, 2010. [Consulta: 2 octubre 2024]. Disponible en: http://www.cromlab.es/Articulos/Metodos/EPA/9000/9050a.pdf

26. **EPA.** *Método 3550 C: Extracción ultrasónica.* [En línea]. EPA, 2007. [consulta: 2 octubre 2024]. Disponible en: https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/3550c.pdf

27. **EPA.** *Método 9050A: Conductividad eléctrica*. [En línea]. EPA, 1996. [consulta: 2 octubre 2024]. Disponible en: http://www.cromlab.es/Articulos/Metodos/EPA/9000/9050a.pdf

28. **EPA**. *SW-846 Método de prueba 9045D: pH del suelo y de los residuos.* [En línea]. EPA, 2004 [consulta: 2 octubre 2024]. Disponible en: https://www.epa.gov/hw-sw846/sw-846-test-method-9045d-soil-and-waste-ph

29. **FABELO FALCÓN, José Antonio.** "Propuesta de metodología para la recuperación de suelos contaminados". *Centro Azúcar* [en línea], 2017, (Cuba), vol. 44 (1). págs. 53-60. [Consulta: 11 diciembre 2023]. ISSN 2223-4861. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2223-48612017000100006&script=sci_arttext&tlng=pt

30. **FAJARDO ROQUILLO, Vanessa.** "Incidencia de la Caída de los Precios del Petróleo en la Economía Latinoamericana". *Polo del Conocimiento* [en línea], 2020, (Ecuador), vol. 5 (03), págs. 1054-1067. [Consulta: 27 noviembre 2023]. ISSN 2550-682X. Disponible en: https://polodelconocimiento.com/ojs/index.php/es/article/view/1843/3578

31. **FAO.** *Según la FAO y el PNUMA, el empeoramiento de la contaminación del suelo es una amenaza para la producción de alimentos y los ecosistemas en el futuro.* [blog]. ReliefWeb, 2021. [Consulta: 13 diciembre 2023]. Disponible en: https://reliefweb.int/report/world/seg-n-la-fao-y-el-pnuma-el-empeoramiento-de-la-contaminaci-n-del-suelo-es-una-amenaza#:~:text=4%20de%20junio%20de%202021%2C%20Roma%20-%20El,las%20Naciones%20Unidas%20para%20el%20Medio%20Ambiente%20%28PNUMA%29

32. **FERNÁNDEZ, Ricardo.** *Manual de salud ambiental infantil para enseñanza de grado en Escuelas de Medicina.* [en línea]. Santiago de Chile-Chile: LOM ediciones, 2009. [Consulta: 19 noviembre 2023]. Disponible en: https://studylib.es/doc/7664916/manual-de-salud-ambiental-infantil

33. **FIESTAS CASTRO, Cecilia Nora Eliza & VÁSQUEZ VILLALOBOS, Walter Alexander**. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad César Vallejo, Ingeniería y Arquitectura. Chiclayo-Perú. 2020. págs. 10-27. [Consulta: 2024-02-0]. Disponible en: https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/60270/Fiestas_CCNE-V%c3%a1squez_VWA-SD.pdf?sequence=1&isAllowed=y

34. **FUNDACIÓN Chile.** *Manual de tecnologías de remediación de sitios contaminados* [en línea]. Santiago de Chile-Chile: Fundación de Chile, 2015. [Consulta: 02 diciembre 2023]. Disponible: https://fch.cl/wp-content/uploads/2019/10/manual-de-tecnologias-de-remediacion-de-sitios-contaminados_baja-1.pdf

35. **GADEA, CARRERA, Enrique & GUARDINO SOLÁ, Xavier.** *NTP 276: Eliminación de residuos en el laboratorio: procedimientos generales*. [blog]. España: Centro nacional de condiciones de trabajo, 2021. [Consulta: 07 diciembre 2023]. Disponible en: https://www.insst.es/documents/94886/327166/ntp_276.pdf/99241f92-8c26-400b-9cc6-909f6e19aece

36. **GALÁN, Emilio y ROMERO, Antonio.** "Contaminación de Suelos por Metales Pesados". *Revista de la Sociedad Española de Mineralogía* [en línea], 2008, (España), vol. 10 (1), págs. 48-60 [Consulta: 12 diciembre 2023]. ISSN 1885-7264. Disponible en: https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6404529

37. **GARCÍA GONZÁLEZ, Judit: et al.** "Bioremediación de hidrocarburos en aguas residuales con cultivo mixto de microorganismos: caso Lubricadora Puyango". *Enfoque UTE* [en línea], 2019, (Ecuador), vol. 10 (1), págs. 185-196. [Consulta: 12 diciembre 2023]. ISSN 1390-6542. Disponible en: http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?pid=S1390-65422019000100185&script=sci_arttext

38. **GARCÍA CIENFUEGOS, Roxana; et al.** "Biorremediación de mercurio en suelos mediante Zea Mays Inoculado con *Pseudomonas Pseudomonas Putida* y la Adicción de Compost". *Universidad Autónoma de Bucaramanga* [en línea], 2021, (Colombia), págs. 6-16. [Consulta: 20 enero 2024]. Disponible en: http://hdl.handle.net/20.500.12749/16181

39. **GOBERNADO, Miguel & LÓPEZ HONTANGAS, J.** "Identificación bacteriana". *El sevier* [en línea], 2003. (España), págs. 56-59. [Consulta: 20 enero 2024]. Disponible en:

https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-identificacion-bacteriana-13059086

40. **GÓMEZ INCA, Ambar Nicole & VÉLIZ GARCÍA**, Angie Mariela. Caracterización del perfil de susceptibilidad de *Pseudomonas* spp. en cepas procedentes del cepario de la carrera de laboratorio clínico- PUCE. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Mestría). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Medicina. Quito-Ecuador. 2023. págs. 32-36. [Consulta: 2024-02-15]. Disponible en: https://repositorio.puce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/632aca82-2223-490f-ab64-328d61ccc21d/content

41. **GÓMEZ RIVERA, María Elizabeth.** Estudio comparativo de la biodegradación de hidrocarburos totales de petroleo (tph´s) a través de la atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación en un suelo contaminado. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad Pontificia Bolivariana, Ingeniería Ambinetal, Ingenierías y Administración. Bucaramanga-Colombia. 2012. págs. 28-29. [Consulta: 2023-12-10]. Disponible en: https://repository.upb.edu.co/bitstream/handle/20.500.11912/2022/digital_24073.pdf?sequence=1&isAllowed=y

42. **GÓMEZ REYES, Ricardo; et al.** "Aislamiento y análisis cualitativo de biomasa microbiana fúngica degradadora de hidrocarburos de un cenote de Quintana Roo". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* [en línea], 2017, (México), vol. 33, págs. 53-61. [Consulta: 10 enero 2024]. ISSN 0188-4999. Disponible en: https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/RICA.2017.33.esp01.05

43. **GÓMEZ ROMERO, Sara; et al.** " Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos". *NOVA Publicación científica en ciencias biomédicas* [en línea], 2008, (Colombia), vol. 6 (9), págs. 76-84. [Consulta: 13 diciembre 2023]. ISSN 1794-2470. Disponible en: https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/398/1158

44. **GONZÁLEZ, Mariana; et al. 2021.** *Impacto de los derrames de Petróleo en la Amazonía Ecuatoriana*. [blog]. Quito: 20 de octubre, 2021. [Consulta: 02 noviembre 2023]. Disponible en: https://www.accionecologica.org/impacto-de-los-derrames-de-petroleo-en-la-amazonia-ecuatoriana/

45. **GOYA CASTRO, N. I.,** 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, Guayaquil-Ecuador. 2020. pág. 80. [Consulta: 2023-10-10]. Disponible en: http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/51387.

46. **GUTIÉRREZ JIMÉNEZ, Javier; et al.** "Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Arte de Chiapas (UNICACH), México". *Revista de la Sociedad Venezolano de Microbiología.* [en línea], 2015, (México), vol. 35(1), págs. 95-101. [Consulta: 2024-01-8]. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562015000200007

47. **GUZMÁN PÉREZ, Sebastián.** Aislamiento de Bacteriocinas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad de las Américas Puebla. (Puebla-México). 2017. pág. 11 [Consulta: 15 marzo 2024]. Disponible en: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lbc/guzman_perez_s/

48. **HERNÁNDEZ CALLEJA, Ana.** *Contaminantes biológicos: criterios de valoración.* [blog] . España: Ministerio de Trabajo y Seguridad Social de España, 1999. [Consulta: 12 noviembre 2023]. Disponible en: https://www.cso.go.cr/legislacion/notas_tecnicas_preventivas_insht/NTP%20409%20-%20Contaminantes%20biologicos%20criterios%20de%20valoracion.pdf

49. **HERNÁNDEZ ACOSTA, Elizabeth; et al.** "Caracterización del suelo y plantas de un sitio contaminado con hidrocarburos". *Terra Latinoamericana* [en línea], 2006, (México), vol. 24(4), págs. 463-469. [Consulta: 06 marzo 2024]. ISSN: 1885-7264. Disponible en: https://www.academia.edu/111189355/Caracterizaci%C3%B3n_Del_Suelo_y_Plantas_De_Un_Sitio_Contaminado_Con_Hidrocarburos

50. **HUNG SOO, Joo; et al.** "Biorremediación de suelos contaminados con petróleo con Candida catenulata y residuos alimentarios". *Sciencedirect* [en línea], 2008, vol. 156 (1), págs. 1-3. [Consulta: 23 diciembre 2023]. Número ISSN: 0269-7491 Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749108002923

51. **HURTADO MELO, Sergio.** Diseño básico de una planta de desorción térmica para tratamiento de suelos contaminados. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Escuela

Superior de Ingenieros de Sevilla, Departamento de ingeniería química y ambiental. Sevilla -España. 2010. págs. 14-32. [Consulta: 2023-11-30]. Disponible en: https://biblus.us.es/bibing/proyectos/abreproy/20229/fichero/2.+Memoria+del+Proyecto%252F4.++Principales+m%C3%A9todos+de+descontaminaci%C3%B3n+de+suelos.pdf

52. **ISHANOGLU, Vartán.** Selección e identificación de hongos magalláicos potencialmente degradadores de hidrocarburos: características biocinéticas. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Pontificia Universidad Católica de Chile, Ingeniería. Santiago de Chile-Chile. 2010. págs. 2-3. [Consulta: 2024-01-10]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Vartan-Ishanoglu/publication/279191816_Seleccion_e_idetificacion_de_hongos_magallanicos_potencialmente_degradadores_de_hidrocarburos_caracteristicas_biocineticas/links/558d786c08ae47a3490bc813/Seleccion-e-idetificacion

53. **JIMÉNEZ MIRANDA, Neider Alfonso.** Mantenimiento y conservación de cepas de referencia para el control de calidad de los métodos de análisis del laboratorio de microbiología. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad de Pamplona, Pamplona-España. 2018. pág. 29 [Consulta: 2023-12-15]. Disponible en: http://repositoriodspace.unipamplona.edu.co/jspui/bitstream/20.500.12744/2428/1/Jim%C3%A9nez_Miranda_2018_TG.pdf

54. **KOPYTKO, María; et al.** "Evaluación del potencial de biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo (tph) en suelos contaminados procedentes de petrosantander (COLOMBIA) INC". *Repositorio UPB* [en línea], 2009, (Colombia) vol. 3(1), págs. 35-46 [Consulta: 22 diciembre 2023]. Disponible en: https://repository.upb.edu.co/handle/20.500.11912/8076

55. **LICTA VEGA, Edwin Geovanny.** Bioaumentación mediante el uso de microorganismos autóctonos para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos totales de petróleo. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestria). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ciencias. Riobamba-Ecuador. 2020. págs. 1-6. [Consulta: 2023-60-20]. Disponible en: http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/14264/1/236T0490.pdf

56. **LÓPEZ MARTÍNEZ, Roxana Margarita.** *Biorremediación: el poder en la naturaleza*. [blog]. Brasil, *Revista de Biología Tropical*, 2019. [Consulta: 23 diciembre 2023]. Disponible en: https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/38695

57. **LÓPEZ HONTANGAS, J; et al.** "Técnicas de identificación". *Researchgate* [en línea], 2015, (España), vol. 1 (1), págs. 28–34. [Consulta: 5 marzo 2024]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/266052838_Tecnicas_de_identificacion

58. **MAPOSITA LLAMUCA, Margarita; et al.** Caracterización microbiológica en suelos contaminados por hidrocarburos, de tipos *Pseudomonas* en el sector de Rio Bonanza, provincia de Pastaza. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Escuela de ingeniería politécnica del litoral, Ingeniería marítima y ciencias del mar. Guayaquil-Ecuador. 2010. págs. 8-9. [Consulta: 2023-06-20]. Disponible en: https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/17198/1/D-61813%20Maposita-Fiallos-Calle.pdf

59. **MARTÍNEZ, Víctor & LÓPEZ Felipe.** "Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso" *Tierra Latinoamericana* [en línea], 2001, (México), vol. 19 (19), págs. 27-41. [Consulta: 5 marzo 2024]. Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57319102

60. **MATA GUADARRAMA, Miguel Angel.** Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos pesados utilizando biosurfactantes y surfactantes químicos. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad Autónoma Metropolitana. Ciudad de México-México. 2023. págs. 8-10. [Consulta: 2023-12-19]. Disponible en: https://zaloamati.azc.uam.mx/bitstream/handle/11191/9922/Remediacion_de_suelos_contaminados_Mata_Guadarrama_M_2023.pdf?sequence=1

61. **MEJÍA, Raúl Felipe.** *Hidrocarburos: manejo seguro* [en línea]. 4ª ed. Bogotá-Colombia: Ecoe Ediciones, 2010. [Consulta: 12 noviembre 2023]. Disponible en: https://www.sancristoballibros.com/libro/hidrocarburos_15013#:~:text=El%20petr%C3%B3leo%20es%20motor%20de%20progreso%2C%20desarrollo%20y,y%20segura%20de%20nuestro%20promisorio%20recurso%3A%20el%20petr%C3%B3leo.

62. **MENDOZA OTERO, Almendra Jordana & PAZO FIESTAS, Sonia Mercedes.** Evaluación del microorganismo degradador de hidrocarburos en suelos contaminados en Jabonillal - Talara 2021. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad César Vallejo, Ingeniería y Arquitectura, Profesional de Ingeniería Ambiental. Lima-Perú. 2021. págs. 11-12. [Consulta: 2023-12-20]. Disponible en:

https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/84708/Mendoza_OAJ-Pazo_FSM-SD.pdf?sequence=1&isAllowed=y

63. **Ministerio De Ambiente Agua y Transición Ecológica**. Acuerdo Ministerial 097-A, Anexos de Normativa, Reforma Libro VI del Texto Unificado De Legislación Secundaria Del Ministerio Del Ambiente. *Ministerio de Telecomunicaciones y de la Sociedad de la Información*. [En línea]. Ecuador, *2015*. [Consulta: 4 noviembre 2023]. Disponible en: https://www.gob.ec/regulaciones/acuerdo-ministerial-097-anexos-normativa-reforma-libro-vi-texto-unificado-legislacion-secundaria-ministerio-ambiente

64. **Ministerio del Ambiente Agua y Transición Ecológica**. *Trámites y Servicios Institucionales*. [blog]. Ecuador: Portal Único de Trámites Ciudadanos, 2023. [Consulta: 25 septiembre 2023]. Disponible en: https://www.gob.ec/maae

65. **MORALES BAUTISTA**, **C. M; et al.** "Cambios en las propiedades físicas y químicas de un suelo debido a un proceso de restauración aplicado a un derrame de hidrocarburos". *Revista Acta Universitaria* [en línea], 2019, (México), vol. 29(1), pág.2. [Consulta: 07 enero 2024]. ISSN: 0188-6266. Disponible en: https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7353878

66. **MUÑOZ CUAICAL, Stalin.** 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. Quito-Ecuador. 2016. págs. 1-27. [Consulta: 2023-06-20]. Disponible en: https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13228/1/UPS-QT10474.pdf

67. **NAETH, Annne; et al.** *Recuperación de suelos y remediación de tierras perturbadas* [en línea]. Estados Unidos. LibreTexts libraries. 2024. [Consulta: 10 enero 2024]. Disponible en: https://espanol.libretexts.org/Geociencias/Ciencia_del_Suelo/Excavando_en_suelos_canadienses%3A_una_introducci%C3%B3n_a_la_ciencia_del_suelo/03%3A_Profundizando/3.03%3A_Recuperaci%C3%B3n_de_suelos_y_remediaci%C3%B3n_de_tierras_perturbadas

68. **NIÑO ZÁRATE, José Manuel.** Biorremediación en suelos contaminados por hidrocarburos de petróleo: Retos y oportunidades para Colombia en el marco de los Objetivos de Desarrollo Sostenible. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad de los Andes,

Ciencias. Bogotá-Colombia. 2023. pág. 31. [Consulta: 2023-12-10]. Disponible en: https://repositorio.uniandes.edu.co/server/api/core/bitstreams/752da528-51eb-413b-9312-4c301b4a81b0/content

69. **ÑUSTEZ CUARTAS, Diana Cristina.** Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad Tecnológica de Pereira. Risaralda-Colombia. 2012. pág. 10. [Consulta: 2023-11-19]. Disponible en: https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/7b71c653-d52e-4931-9fd3-5d6017a692ff/content

70. **OBISPO SILVA, Paola Yeruxa & RAMOS JIMÉNEZ, Cristhian Jahir.** Biorremediación mediante el uso de *Auricularia* sp. en suelo agrícola contaminado por petróleo analizando la fracción 2 y 3 de hidrocarburo desarrollado en la Universidad Nacional del Callao. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad Nacional del Callao, Ingeniería Ambiental y de Recursos Naturales, Profecional de Ingeniería Ambiental y Recursos Naturales. Callao-Perú. 2019. pág. 28. [Consulta: 2023-12-10]. Disponible en: https://repositorio.unac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12952/4080/OBISPO-RAMOS_pregrado_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y

71. **OCHOA, Sara; et al.** "Características patogénicas de cepas de P*seudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas". *Boletín médico del Hospital Infantil de México* [en línea], 2013, (México), vol. 70 (2), págs. 136-150. [CONSULTA: 10 enero 32024]. ISSN 1665-1146. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462013000200010

72. **OLGUÍN, Eugenia et al**. "Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración" *Revista internacional de contaminación ambiental* [en línea], 2007, (México), vol.23 (3), pág. 139. [Consulta: 14 febrero 2023]. ISSN 0188-4999. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-49992007000300004&script=sci_abstract&tlng=pt

73. **ONU.** *La biodiversidad de los suelos es ignorada, pero es fundamental para alimentar al planeta*. [blog]. Naciones Unidas, 2020. [Consulta: 02 diciembre 2023]. Disponible en: https://news.un.org/es/story/2020/12/1485132

74. **ONU, Programa para el Medio Ambiente.** *¿Es el suelo tan importanye?* [blog]. 2018. [Consulta: 11 diciembre 2023]. Disponible en: https://www.unep.org/es/noticias-y-reportajes/reportajes/es-el-suelo-tan-importante#:~:text=El%20suelo%20es%20el%20fundamento,las%20personas%20y%20los%20animales.

75. **Organización de Países Exportadores de Petróleo.** *Reservas mundiales provadas de crudo.* [blog]. 2023. [Consulta: 28 noviembre 2023]. Disponible en: https://asb.opec.org/ASB_Charts.html?chapter=1525.

76. **ORTIZ, E; et al.** "Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos". *Revista Contribución a la Educación y la Protección del Medio Ambiente* [en línea], 2005, (Cuba), vol. 6, págs. 50-61. [Consulta: 03 diciembre 2023]. Disponible en: https://aquadocs.org/bitstream/handle/1834/3650/Biorrremediaci%c3%b3n%20de%20suelos%20contaminados%5b1%5d.....pdf?sequence=1&isAllowed=y

77. **PADILLA GARFIAS, Francisco; et al.** "Levaduras degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos". *Revista de Educación Bioquímica* [en línea], 2021, (México), vol. 40 (4), págs. 178-188. [Consulta: 06 enero 2024]. Disponible en: https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2021/reb214d.pdf

78. **PARI PILCO, Greysy Marilia & YACOLCA TORRES, Karolay Vanessa.** Afectación de la calidad del suelo por la incorrecta manipulación y almacenamiento de las fracciones de hidrocarburos F1 y F3, en la empresa Bike Tuning, Arequipa – 2018. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad Tenológica de Perú, Ingeniería. Arequipa-Perú. 2019. pág. 12. [Consulta: 2023-12-04]. Disponible en: https://repositorio.utp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12867/1882/Greysy%20Pari_Karolay%20Yacolca_Tesis_Titulo%20Profesional_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y

79. **PAZ ZARZA, Victor Manuel; et al.** "*Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria". *Revista chilena de infectología* [en línea], 2019, (Chile), vol. 36 (2), págs. 180-189. [Consulta: 20 diciembre 2023]. ISSN 0716-1018. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182019000200180

80. **PÉREZ POZO, Marco Rafael.** Evaluación de la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando *Pseudomonas fluorescens*. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. Quito-Ecuador. 2018. pág. 18. [Consulta: 2024-01-10]. Disponible en: https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15446/1/UPS-QT12601.pdf

81. **PÉREZ SILVA, Rosa María; et al.** "Aislamiento y selección de una cepa bacteriandegradadora de hidrocarburos a partir de suelocontaminados con petróleo". *CENIC Ciencias Biológicas* [en línea], 2008, (Cuba), vol. 39 (1), págs. 44-51. [Consulta: 20 enero 2024]. ISSN 0253-5688. Disponible en: https://www.redalyc.org/pdf/1812/181214889004.pdf

82. **PINO RODRÍGUEZ, Nancy; et al."** Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con diesel". *Producción + Limpia* [en línea], 2012, (Colombia), vol. 7 (1), págs. 101-108. [Consulta: 04 diciembre 2023]. ISSN 1909-0455. Disponible en: http://revistas.unilasallista.edu.co/index.php/pl/article/view/247/118

83. **PIZARRO RESTREPO, Christian José.** Métodos analíticos aplicados en la cuantificación de la biodegradacion de hidrocarburos totales de petróleo. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad de Córdoba. Montería-Colombia. 2021. pág. 16. [Consulta: 2023-11-19]. Disponible en: https://repositorio.unicordoba.edu.co/server/api/core/bitstreams/6e875573-7708-4874-a5d9-1c2e796eb7f0/content

84. **PULIDO, Victor; et al.** "Efectos del derrame de petróleo en la Refinería la Pampilla en las costas del litoral marino, Lima (Perú)". *Rev. investig. Altoandin* [en línea], 2022, (Perú), vol. 24 (1), págs. 5-8. [Consulta: 22 julio 2023]. ISSN 2313-2957. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2313-29572022000100005&script=sci_arttext&tlng=pt

85. **PUMA, Erika & PALOMINO, Kevin**. "Caracterización de *Pseudomonas* sp. en aguas residuales de cuatro restaurantes de la ciudad del Cusco, Perú". Avances en Ciencias e Ingeniería [en línea], 2019, (Perú), vol. 10 (4), págs. 15-21. [Consulta: 15 febrero 2024]. ISSN 0718-8706. Disponible en: https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7464977

86. ***Revista de la Sociedad Española de Mineralogía*** [en línea], 2008, (España), vol. 1(10), pág.48. [Consulta: 06 marzo 2024]. ISSN: 1885-7264. Disponible en:

https://www.semineral.es/websem/PdfServlet?mod=archivos&subMod=publicaciones&archivo=Macla10_48.pdf

87. **RAMIREZ AGUILERA, Juana; et al.** *Manual de laboratorio de microbiología* [en línea], México*: Universidad Veracruzana*, 2018. [Consulta: 06 marzo 2024]. Disponible en: https://www.uv.mx/qfb/files/2020/09/Guia-de-Microbiologia.pdf

88. **RAMÓN ALEJANDRO, Ximena Fiorella. 2019.** Comportamiento de bacterias y hongos en la degradación dehidrocarburos en suelos contaminados. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad Científica del Sur, Ciencias Ambientales. Lima-Perú. 2019. págs. 8-9. [Consulta: 2024-01-04]. Disponible en: https://repositorio.cientifica.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12805/1501/TB-Ram%c3%b3n%20X.pdf?sequence=1&isAllowed=y

89. **REYNOSO, María; et al.** *Manual de microbiología general* [en línea]. Argentina: Universidad Nacional de Río Cuarto. 2024. [Consulta: 12 noviembre 2023]. Disponible en: https://espanol.libretexts.org/Biologia/Microbiolog%C3%ADa/Manual_de_microbiolog%C3%ADa_general/02%3A_Fundamentos_de_microscopia_montaje_y_coloraciones_de_muestras/2.04%3A_Preparacion_de_muestras_para_microscopia_optica

90. RICSE CONDOR, Rudy Shave & SOLIS RICALDI, Carlos Daniel. Biodegradación de petróleo en suelo contaminado utilizando *Pseudomonas fluorescens* en Mazamari 2021. [En línea]. (trabajo de titulación) (Maestría). Universidad César Vallejo, Ingeniería y Arquitectura. Lima-Perú. 2021. pág. 106. [Consulta: 2024-02-10]. Disponible en: https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/78935/Ricse_CRS-Solis_RCD-SD.pdf?sequence=1&isAllowed=y

91. **RIVERA, María del Carmen; et al. y otros."**Adaptacion y seleccion de microorganismos autoctonos en medios de cultivos enriquecidos con petroleo crudo". *Terra Latinoamericana* [en línea], 2002, (México), vol. 20 (4), págs. 423-434. [Consulta: 06 enero 2024]. ISSN 2395-8030. Disponible en: https://www.redalyc.org/pdf/573/57320407.pdf

92. **RODRIGUEZ MONTENEGRO, Luis Carlos; et al.** Evaluación de la efectividad de la técnica de bioaumentación en sedimentos contaminados con hidrocarburos de una estación de servicio de combustibles del Municipio de San Francisco Putumayo. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Instituto Tecnológico del Putumayo, Ingeniería ambiental. Putumayo-Colombia. 2017. págs. 35-40. [Consulta: 2023-12-01]. Disponible en:

https://itp.edu.co/web2016/phocadownload/Investigacion/Semilleros/Conservemos_nuestros_suelos/INVESTIGACION%20BIOAUMENTACION%20SIBUNDOY%20(2017).pdf

93. **RODRÍGUEZ, Apolonia; et al.** "Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar biorremediación". *Ciencias Ambientales* [en línea], 2022, (Costa Rica), vol. 56 (1), págs. 178-208. [Consulta: 19 junio 2023]. ISSN 1409-2158. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S2215-38962022000100178&script=sci_arttext

94. **ROJAS TRIVIÑO, Alberto.** *Conceptos y práctica de microbiología general* [en línea]. Palmita-Colombia: Universidad Nacional de Colombia Sede Palmina, 2011. [Consulta: 20 diciembre 2023]. Disponible en: https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/8391/albertorojastrivino.2011.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

95. **RUIZ TORRADO, Ana Caroline.** Efecto del biocarbón en la inmovilización de hidrocarburos en suelos contaminados. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad Científica del Sur, Ciencias Ambientales. Lima-Perú. 2019. pág. 5. [Consulta: 2023-12-11]. Disponible en: https://repositorio.cientifica.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12805/2022/TB-Ruiz%20A-Ext.pdf?sequence=1&isAllowed=y

96. **RUIZ MARÍNEZ, Lídia.** *Pseudomonas aeruginosa*: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. [En línea]. (Trabajo de tiutlación) (Doctoral). Universidad de Barcelona. Barcelona-España. 2007. págs. 2-16. [Consulta: 2024-02-8]. Disponible en: https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2521/LRM_TESIS.pdf?se.

97. **RUIZ AGILA, Gabriela.** *Un ambiente tóxico: son continuos los derrames petroleros sin remedio en Ecuador*. [blog]. 2022. [Consulta: 29 noviembre 2023]. Disponible en: https://www.opendemocracy.net/es/ambiente-toxico-scontinuos-derrames-petroleros-secuador/

98. **SAID AABIDA, Azman.** Tecnologías físico-químicas en la regeneración de suelos contaminados. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad de Sevilla, Escuela Técnica Superior de Ingeniería. Sevilla-España. 2018. págs 46-62. [Consulta: 2023-

12-02]. Disponible en: https://biblus.us.es/bibing/proyectos/abreproy/71126/fichero/TFM-1126-SAID.pdf

99. **SALAS, Liliana.** Contaminación del suelo con hidrocarburos de petróleo en los centros de atención automotriz del distrito de Huancavelica, Perú. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad Continental. Huancayo-Perú. 2023. págs. 18-19. [Consulta: 2023-11-19]. Disponible en:https://repositorio.continental.edu.pe/bitstream/20.500.12394/13438/3/IV_FIN_107_TE_Vergara_Salas_2023.pdf

100. **SANZ CERVERA, Susana.** *Prácticas de Microbiología* [en línea]. 2ed. España: Universidad de la Rioja, 2011. [Consulta: 10 octubre 2023]. Disponible en: https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=100835

101. **SCHROEDER, Adams et al**. "Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano" *Terra Latinoamericana* [en línea], 1999, (México), vol.17 (2), pág. 162. [Consulta: 09 noviembre 2023]. ISSN 2395-8030. Disponible en: https://www.redalyc.org/ articulo.oa?id=57317209

102. **SUAREZ BELTRAN, Rolando Mauricio.** Guía de métodos de biorremediación para la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad Libre. Bogotá-Colombia. 2013. págs. 4-13. [Consulta: 2023-12-02]. Disponible en: https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/10607/TRABAJO%20FINAL%20cd.pdf?sequence=1&isAllowed=y

103. **TANKESHWAR, Acharya.** *Preparación de los estándares de turbidez de McFarland*. [blog]. Nepal: Microe online, 2016. [Consulta: 2 de marzo 202]. Disponible en: https://microbeonline.com/preparation-mcfarland-turbidity-standards/

104. **TORRES ORDOÑEZ, 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, Ecuador. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ciencias Humanas, Ciencias Geográficas. Quito-Ecuador. 2019. pág. 19. [Consulta: 2023-12-04]. Disponible en:

https://repositorio.puce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/0e3c3d2f-217b-4eec-b84f-f5c80c17f49f/content

105. **TRUJILLO GALLEGOS, Karen Adriana; et al.** *Aislamiento de cepas de hongos degradadores de hidrocarburos de un suelo contaminado con petróleo*. [blog]. Guadalajara: 2015. [Consulta: 15 enero 2024]. Disponible en: https://smbb.mx/congresos%20smbb/guadalajara15/PDF/XVI/trabajos/VI/VIC-05.pdf

106. **VALENZUELA, Ibonne; et al.** " técnicas de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos con fines de uso en el Municipio de Tibú, norte de Santander". *Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo* [en línea], 2021, (Colombia), vol. 51 (1), págs. 107-118. [Consulta: 10 f4ebrero 2024]. ISSN 0562-5351. Disponible en: https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8234914

107. **VEGA GARZÓN, Lina; et al.** *Guía de Prácticas de Laboratorio de Microbiología Ambiental_Unido* [en línea]. Colombia: Universidad Santo Tomas, 2022. [Consulta: 5 de marzo 2024]. Disponible en: https://repository.usta.edu.co/handle/11634/50563

108. **VEGA JARA, Liliana.** *Aplicación de métodos físico-químicos y biológicos en suelos contaminados con Cadmio y Plomo* [en línea]. Huánuco-Perú: UNHEVAL, 2021. [Consulta: 21 noviembre 2023]. Disponible en: https://www.unheval.edu.pe/portal/wp-content/uploads/2021/03/libro-Vega-Jara-L.-2021.pdf

109. **VELÁSQUEZ, Johana**. "Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Análisis de la fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación". *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* [en línea], 2017, (Colombia), vol. 8 (1), pág. 156. [Consulta: 19 noviembre 2023]. ISSN 2145-6097. Disponible en: https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/1846/2227

110. **VERA CEDEÑO, Darío Fabián.** Composición de microorganismos eficientes autóctonos de un suelo contaminado por hidrocarburos. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López. Calceta-Ecuador. 2016. págs. 7-9. [Consulta: 2023-12-10]. Disponible en: https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/279/1/TMA81.pdf

111. **VOLKE SEPÚLVEDA, Tania. & VELASCO TREJO, Juan.** *Tecnologías de remediación para suelos contaminados* [en línea]. México: SEMARNAP, Instituto Nacional

de Ecología, 2002. [Consulta: 20 diciembre 2023]. Disponible en:. https://books.google.com.ec/books?id=mj9rVEScHCcC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false

Cristian Tenelanda. S.

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS
DBRAI
ESPOCH

ANEXOS

ANEXO A: REGISTRO FOTOGRÁFICO DE LA FASE DE LA ELABORACIÓN

FOTOGRAFÍA 1: CONSTRUCCIÓN DE LA CAMA PARA LA HOMOGENEIZACIÓN DEL SUELO	**FOTOGRAFÍA 2:** HOMOGENEIZACIÓN DEL SUELO
FOTOGRAFÍA 3: DIVISIÓN DEL ÁREA PARA LA TOMA DE MUESTRA	**FOTOGRAFÍA 4:** MUESTRA DEL SUELO CONTAMINADO

FOTOGRAFÍA 5: PESADO DEL SUELO

FOTOGRAFÍA 6: CONSTRUCCIÓN DEL INVERNADERO

FOTOGRAFÍA 7: DIVISIÓN DEL SUELO PARA CADA REPETICIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

FOTOGRAFÍA 8: TRATAMIENTOS CON SUS REPETICIONES

FOTOGRAFÍA 9: PESADO DE LAS MUESTRAS PARA LOS ANÁLISIS

FOTOGRAFÍA 10: MEZCLADO DEL SUELO CON AGUA DESTILADA PARA

FOTOGRAFÍA 11: ANÁLISIS DE pH Y CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

FOTOGRAFÍA 12: TOMA DE TEMPERATURA DEL SUELO

FOTOGRAFÍA 13: MUESTREO DEL SUELO 	**FOTOGRAFÍA 14:** SECADO AL AMBIENTE DE LAS MUESTRAS PARA LOS ANÁLISIS DE TPHs
FOTOGRAFÍA 15: ANÁLISIS DE TPHs 	**FOTOGRAFÍA 16:** PREPARACIÓN DEL AGUA DE PEPTONA PARA LAS DILUCIONES

FOTOGRAFÍA 17: PREPARACIÓN DEL AGAR SELECTIVO CETRIMIDA.

FOTOGRAFÍA 18: PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES

FOTOGRAFÍA 19: FILTRACIÓN MEDIANTE MEMBRANA DE LAS DILUCIONES

FOTOGRAFÍA 20: INCUBACIÓN DE LOS CULTIVOS

FOTOGRAFÍA 21: CONTEO DE COLONIAS MEDIANTE LUZ UV

FOROGRAFÍA 22: SIEMBRA DE LAS CEPAS BACTERIANAS

FOTOGRAFÍA 23: PREPARACIÓN DE LAS CEPAS DE CONSERVACIÓN

FOTOGRAFÍA 24: CATETERIZACIÓN MORFOLÓGICA

FOTOGRAFÍA 25: PRUEBAS BIOQUÍMICAS

FOTOGRAFÍA 26: ESTERILIZACIÓN DEL ASA

FOTOGRAFÍA 27: ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS EN EL CALDO BHI

FOTOGRAFÍA 28: ESTERILIZACIÓN DE LOS ATOMIZADORES

FOTOGRAFÍA 29: PREPARACION DE LA ESCALA MCFARLAND DE 0,5

FOTOGRAFÍA 30: INYECCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

FOTOGRAFÍA 31: PROCESO DE AIREACIÓN AL SUELO

ANEXO B: CERTIFICADO DE AUTENTICIDAD DE LA PRUEBA DE OXIDASA

H24

HARDY DIAGNOSTICS

~ CERTIFICATE OF ANALYSIS ~

Prueba Oxidasa

PREPARED MEDIA, TEST KITS, AND REAGENTS

Product Name:	OxiStrips™
Container Size:	25 strips/vial
Catalog No:	Z93
Lot No:	562788
Manufacture Date:	18/3/2023
Expiration Date:	18/3/2024
Certificate Date:	18/04/2023

This product lot is supplied by Hardy Diagnostics in accordance with its quality management system, which complies with the U.S. Food and Drug Administration's (FDA's) Quality Systems Regulation (QSR) and current Good Manufacturing Practices (cGMP) contained in Title 21 Part 820 of the Code of Federal Regulations (CFR). The company's manufacturing establishments are registered, and its medical devices are listed with the FDA. Hardy Diagnostics' quality management system is certified to ISO 13485 for medical devices.

Representative samples of this lot were tested and found to meet the specifications listed on this certificate and published on the Instructions for Use (IFU) for this product as located on the Hardy Diagnostics website, where applicable. In addition, this lot conforms to the quality control standards listed in the reference document, where indicated. End-users of commercially prepared culture media and reagents should perform QC testing in accordance with applicable government regulatory agencies and in compliance with accreditation requirements. Hardy Diagnostics recommends end-user to check for signs of contamination and deterioration and, if dictated by laboratory quality control procedures or regulation, perform QC testing to demonstrate a positive reaction and/or a negative reaction, if applicable.

Performance Testing

Test Organism	Strain Number	Results**
Pseudomonas aeruginosa	ATCC® 27853*	Oxidase-positive; blue/purple color develops within 10-20 seconds
Neisseria gonorrhoeae	ATCC® 19242*	Oxidase-positive; blue/purple color develops within 10-20 seconds
Escherichia coli	ATCC® 25922*	Oxidase-negative; no color develops

* ATCC® is a registered trademark of the American Type Culture Collection, Manassas, VA 20108, USA

Acceptable growth and/or inhibitory specification with appropriate organisms as described in this document were verified at the time of release.

** Expected results when tested according to the package insert.

Physical Characteristics

Appearance: White reagent test strips with a plastic handle.

Microbial Load Testing

Acceptable microbial load (as described in the "Test for Microbial Load" section of the *Finished Product Quality Control*) was verified at the time of release. Please view the *Finished Product Quality Control* document for more information.

Ingredient Origin

All ingredients of animal origin in this lot have been sourced from Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)-free and Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE)-free countries as identified by the United States Department of Agriculture (USDA). This product complies with 9 CFR 94.18 *"Restrictions on importation of meat and edible products from ruminants due to bovine spongiform encephalopathy."*

Manufacturing Facility

Hardy Diagnostics maintains manufacturing facilities in both Santa Maria, California and Springboro, Ohio. The manufacturing location can be determined from the lot number. If the lot number begins with the number 1, 2, or 3, the product was manufactured in Springboro, Ohio; if the lot number begins with the number 4 or higher, the product was manufactured in Santa Maria, California.

llega: 28-04-2023
Revisado por : MP.

ANEXO C: RESULTADOS DE LAS PRUEBAS MOLECULARES DE LOS AISLADOS BACTERIANOS

Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro
Teléfono: 0998982450
e-mail: idgen.ecuador@gmail.com
R.U.C. 1713443479001

Informe de Resultados

Nombre del Proyecto: Aislamiento e Identificación molecular de microorganismos – Cecilia Mala
Informe No.: A-468.2
Técnico Responsable: Sofía Garrido, Ing.
Fecha: 12/08/2023

Resultados

Código IDgen	Código original	Longitud	% de Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	NºAccesión
B667c	Muestra 1, Dilución S, Fco. de Orellana	1390	94.4	*Pseudomonas aeruginosa*	16S	99.9	MT646431.1
B667d	Muesta 1, Dilución S, Fco. de Orellana	1230	93.9	*Pseudomonas fluorescens*	16S	100	MG461471.1

Firma autorizada
Francisco Javier Flores Flor, PhD.
Propietario IDgen

Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro
Teléfono: 0998982450
e-mail: idgen.ecuador@gmail.com
R.U.C. 1713443479001

Detalle de Resultados

Nombre del Proyecto: Aislamiento e Identificación molecular de microorganismos – Cecilia Mala
Informe No.: A-468.2
Técnico Responsable: Sofía Garrido, Ing.
Fecha: 12/08/2023

Estudio: Identificación molecular (extracción de ADN, amplificación de barcode, secuenciación estándar, ensamblaje de productos de PCR y búsqueda en base de datos).

Detalles técnicos:

Muestras usadas: Aislados en caja petri

Método de determinación: Identificación molecular por barcoding.

Procedimiento:

- La extracción de ADN se realizó por métodos convencionales utilizando aproximadamente 100mg de pellet.
- Se evaluó la integridad y calidad del ADN mediante espectrofotometría de microvolúmenes y visualización en gel de agarosa.
- El ADN obtenido se diluyó hasta una concentración de aproximadamente 20ng/uL para la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- Se utilizaron los primers específicos para el género *Pseudomonas* PseuFor/PseuRev[1] como prueba preliminar y posteriormente los primers universales 27F_1492R[2] para la secuenciación.
- Los productos de PCR fueron purificados previo a la secuenciación por el método SANGER
- Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas usando programas bioinformáticos.
- Se compararon las secuencias ensambladas con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI.

Resultados:

Se obtuvo ADN de alta calidad para el proceso de PCR convencional de las 19 muestras. Se ensambló la reacción de PCR visualizándose fragmentos de aproximadamente 1200pb en las muestras amplificadas.

[1] Purohit, Hemant & Raje, D & Kapley, Atya. (2003). Identification of signature and primers specific to genus *Pseudomonas* using mismatched patterns of 16S rDNA sequences. BMC bioinformatics. 4. 19. 10.1186/1471-2105-4-19

[2] Wilson, K. H., Blitchington, R. B., & Greene, R. C. (1991). Amplification of Bacterial 16S Ribosomal DNA with Polymerase Chain Reaction. Journal of Clinical Microbiology, 29(3), 666.

Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro
Teléfono: 0998982450
e-mail: idgen.ecuador@gmail.com
R.U.C. 1713443479001

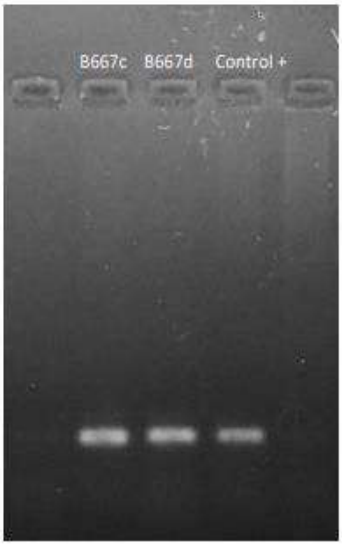


Figura 1. Visualización en gel de agarosa 1% de fragmento, amplificado con los primers especificos PseuFor/PseuRev.

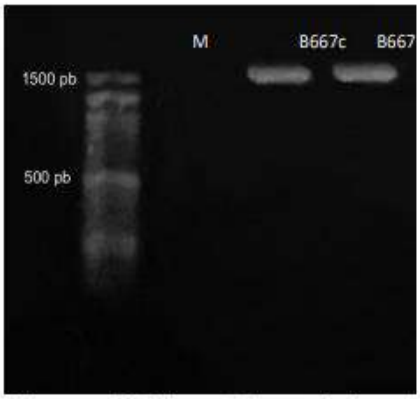


Figura 2. Visualización en gel de agarosa 1% de fragmento de aproximadamente 1500pb, amplificado con primers 27F/1492R para amplificar el gen del 16S. M: Marcador de peso molecular Invitrogen Low Mass Ladder.

Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro
Teléfono: 0998982450
e-mail: idgen.ecuador@gmail.com
R.U.C. 1713443479001

Conclusiones:

1. Se extrajo ADN de las tres muestras bacterianas, con calidad suficiente para la amplificación y secuenciación.
2. En base a las secuencias obtenidas se muestran los resultados de la identificación molecular en la tabla de resultados.

Firma autorizada

Francisco Javier Flores Flor, PhD.

Propietario IDgen

ANEXO D: CONTROLES DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS

TABLA 1: Densidad bacteriana tratamiento A

Tratamiento (A)			
Tiempo (días)	densidad bacteriana (UFC/mL)		
	r1	r2	r3
0	5,60E+06	5,60E+06	5,60E+06
15	7,10E+06	6,65E+06	6,60E+06
30	1,80E+07	1,40E+07	1,50E+07
45	1,90E+07	1,75E+07	1,80E+07

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

TABLA 2: Densidad bacteriana tratamiento B (*Pseudomona fluorescens)*

Tratamiento B			
Tiempo (días)	densidad bacteriana (UFC/mL)		
	r1	r2	r3
0	1,06E+08	1,06E+08	1,06E+08
15	4,30E+08	4,05E+08	4,80E+08
30	5,50E+10	6,20E+10	5,00E+10
45	5,30E+10	6,10E+10	5,20E+10

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

TABLA 3: Densidad bacteriana tratamiento B (*Pseudomona aeruginosa)*

Tratamiento C			
Tiempo (días)	densidad bacteriana (UFC/mL)		
	r1	r2	r3
0	1,06E+08	1,06E+08	1,06E+08
15	4,00E+09	3,70E+09	5,00E+09
30	8,70E+11	8,30E+11	1,00E+12
45	8,09E+11	7,90E+11	1,21E+12

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

TABLA 4: Controles de pH del suelo

Potencial de Hidrógeno (pH)					
Tratamiento	**Repetición**	**Caracterización inicial**	**Control 1**	**Control 2**	**Control 3**
A	1	7,26	7,49	7,75	7,46
	2		7,36	7,67	7,42
	3		7,40	7,55	7,67
B	1		7,50	7,70	7,46
	2		7,48	7,65	7,44
	3		7,52	7,66	7,32
C	1		7,46	7,70	7,34
	2		7,53	7,47	7,34
	3		7,63	7,67	7,40

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

TABLA 5: Controles de temperatura del suelo

Temperatura (°C)					
Tratamiento	**Repetición**	**Caracterización inicial**	**Control 1**	**Control 2**	**Control 3**
A	1	28,05	25,8	26,7	29,4
	2		26,0	27,2	29,6
	3		26,5	27,4	29,3
B	1		26,1	27,3	29,5
	2		26,2	27,6	29,6
	3		26,2	27,5	29,6
C	1		25,8	27,1	29,5
	2		26,00	27,4	29,6
	3		26,2	27,4	29,6

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

TABLA 5: Controles de la humedad del suelo

Conductividad Eléctrica (µS/cm)					
Tratamiento	**Repetición**	**Caracterización inicial**	**Control 1**	**Control 2**	**Control 3**
A	1	143,6	120,1	97	96,6
	2		98,8	121	88,5
	3		100	124	105
B	1		123,5	114,1	108,3
	2		130,9	124,5	80,4
	3		125,1	127,8	107,3
C	1		98,4	123	114,1
	2		106,1	120,9	85,3
	3		112,3	125	88,2

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

TABLA 6: Controles de la humedad del suelo

Humedad (%)					
Tratamiento	**Repetición**	**Caracterización inicial**	**Control 1**	**Control 2**	**Control 3**
A	1	2,63	9,92	20,41	19,34
	2		16,95	21,97	18,23
	3		16,6	22,7	20,1
B	1		16,69	22,86	19,79
	2		17,16	20,12	19,44
	3		15,89	15,76	17,41
C	1		17,34	22,22	21,56
	2		19,78	24,28	18,93
	3		17,63	19,92	20,36

Realizado por: Mala C. y Quingatuña L., 2024

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO DE LA GUÍA PARA NORMALIZACIÓN DE TRABAJOS DE FIN DE GRADO

Fecha de entrega: 05/ 08 / 2024

INFORMACIÓN DE LAS AUTORAS
Nombres – Apellidos: Cecilia Carmen Mala Cortez Lesli Margoth Quingatuña Andy
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Ingeniería Ambiental
Título a optar: Ingeniera Ambiental
Ing. Tannia Jazmín Vargas Tierras, M. Sc **Director del Trabajo de Integración Curricular** Ing. Sandra Elizabeth Suárez Cedillo, M. Sc **Asesor del Trabajo de Integración Curricular**