



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

“EFICIENCIA DEGRADATIVA DE TRES ESPECIES DE HONGOS BENÉFICOS *Aspergillus Niger*, *Thichoderma Harzianum* y *Paecilomyces Lilacinus* SOBRE SUELOS CONTAMINADOS CON PETRÓLEO EN LA PARROQUIA SAN CARLOS DEL CANTÓN JOYA DE LOS SACHAS”

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: Maria Fernanda Loayza Vargas

TUTOR: Dr. Fausto Manolo Yaulema Garcés

RIOBAMBA - ECUADOR

2017

© 2017 Loayza Vargas María Fernanda

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

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

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación: **“EFICIENCIA DEGRADATIVA DE TRES ESPECIES DE HONGOS BENÉFICOS *Aspergillus Niger*, *Thichoderma Harzianum* y *Paecilomyces Lilacinus* SOBRE SUELOS CONTAMINADOS CON PETRÓLEO EN LA PARROQUIA SAN CARLOS DEL CANTÓN JOYA DE LOS SACHAS”**, de responsabilidad de la señorita Loayza Vargas María Fernanda ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizado su presentación.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Dr. Fausto Yaulema

.....

.....

**DIRECTOR TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Dr. Robert Cazar

.....

.....

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Loayza Vargas María Fernanda, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación

Riobamba 10 de Abril 2017,

.....

Loayza Vargas María Fernanda

C.I. 220020796-3

Yo, Maria Fernanda Loayza Vargas soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en el trabajo de titulación y el patrimonio intelectual del trabajo de titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica De Chimborazo

LOAYZA VARGAS MARIA FERNANDA

C.I. 220020796-3

DEDICATORIA

Dedico primeramente mi trabajo a Dios quien supo guiarme por el buen camino, darme la fuerza para seguir adelante y bendecirme en cada instante de mi vida.

A mis queridos padres Marco Loayza y Marcia Vargas quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento, depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento.

A mis hermanos, cuñadas, sobrinitas y mi familia en general por brindarme su apoyo incondicional.

Mafer

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios al creador de todas las cosas el que me ha dado fortaleza para continuar cuando eh estado a punto de caer, por bendecirme y darme la oportunidad de llegar a culminar con éxito mi carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental.

A mis queridos padres Marco Loayza y Marcia Vargas por todo el apoyo incondicional y sus enseñanzas que me brindan desde siempre gracias por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluyen este.

A la gran colaboración de los Doctores Fausto Yulema, Robert Cazar y Norma Erazo, por la invaluable guía y respaldo en la dirección de mi trabajo.

Agradezco a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Escuela de Ciencias Químicas y al personal docente que formaron parte de ella, para instruirme como profesional con ética, valores y virtudes, comprometidas con el desarrollo y progreso de la sociedad.

Mafer

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE GRÁFICOS	xi
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	xii
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xvi
RESUMEN.....	xvii
SUMMARY	xviii
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Identificación del problema.....	1
1.2. Justificación de la investigación.....	2
1.3. Objetivos de la investigación	3
1.3.1. Objetivo general	3
1.3.2. Objetivos específicos.....	3
CAPÍTULO II	
MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Antecedentes de la investigación	4
2.2. Marco Conceptual	6
2.2.1. Suelo contaminado	6
2.2.2. Estructura del suelo	7
2.2.3. Clasificación de la Estructura del Suelo.....	8
2.2.4. La contaminación	9
2.2.5. Causas del Suelo Contaminado	12
2.2.6. Petróleo	13
2.2.7. Hongo Aspergillus Niger	15
2.2.7.1 Usos del Hongo Aspergillus Niger.....	18
2.2.8. Hongo Trichoderma Harzianum.....	20
2.2.9. Hongo Paecilomyces Lilacinus	22
2.2.10. Marco legal.....	24
CAPITULO III	
METODOLOGÍA	25
3.1. Hipótesis y especificación de variables.....	25

3.1.1.	Identificación de variables	25
3.1.2.	Hipótesis.....	25
3.2.	Tipo y diseño de la investigación	26
3.3.	Unidad de análisis	26
3.4.	Población de estudio.....	26
3.5.	Tamaño de la muestra	26
3.6.	Selección de muestra.....	26
3.6.1.	Toma de muestra y caracterización del suelo.....	26
3.7.	Técnicas de recolección de datos	28
3.7.1.	Lugar	28
3.7.2.	Ubicación	30
3.7.3.	Diseño aplicado.....	30
3.7.4.	Lugar de la investigación	30
3.8.	Proceso experimental	31
3.8.1.	Identificación y conteo de los microorganismos en el suelo contaminado con petróleo antes de los tratamientos	31
3.8.2.	Evaluar la eficiencia degradativa de las tres especies de hongos sobre suelo contaminado con petróleo	40
3.8.3.	Evaluar la presencia de los agentes biológicos utilizados después de los tratamientos.	52
CAPÍTULO IV		
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		
4.1.	Análisis de resultados.....	62
4.1.1.	Evaluación de las características físicas, químicas y biológicas de los suelos antes de los tratamientos.	62
4.1.2.	Evaluación de la eficiencia degradativa de las tres especies de hongos sobre suelo contaminado con petróleo.	63
4.1.2.1	Resultados de los análisis del Crecimiento con Suelo Esterilizado.....	63
4.1.2.2	Resultados de los análisis del Crecimiento con Suelo no Esterilizado	65
4.1.2.3	Conteo y Cálculos de esporas.....	68
4.1.2.4	Análisis de la eficiencia degradativa de las tres especies de hongos sobre suelo contaminado con petróleo.	69
4.1.3.	Evaluar la presencia de los agentes biológicos utilizados después de los tratamientos .	69
4.2.	Resultados de los análisis estadísticos.....	70
4.3.	Discusión de resultados	73

CONCLUSIONES	74
RECOMENDACIONES	75
GLOSARIO	
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-2	El suelo.....	7
Gráfico 2-2	Estructura del Suelo	7
Gráfico 3- 2	Tipos de contaminación.....	11
Gráfico 4-2	Cuencas Petrolíferas.....	14
Gráfico 5-2	<i>Aspergillus Niger</i>	16
Gráfico 6-2	Estructura <i>Aspergillus Niger</i>	18
Gráfico 7-2	<i>Trichoderma Harzianum</i>	21
Gráfico 8-2	Hongo <i>Paecilomyces Lilacinus</i>	23
Gráfico 1-3	Mapa de la Parroquia San Carlos.....	29
Gráfico 2-3	Parroquia San Carlos.....	29
Gráfico 1-4	Crecimiento con el Suelo Esterilizado con el hongo <i>Aspergillus Niger</i>	64
Gráfico 2-4	Crecimiento con el suelo Esterilizado con el hongo <i>Thichoderma Harzianum</i>	64
Gráfico 3-4	Crecimiento con el suelo Esterilizado con el hongo <i>Paecilomyces Lilacinus</i>	65
Gráfico 4-4	Crecimiento con el suelo no Esterilizado con el hongo <i>Aspergillus Niger</i>	66
Gráfico 5-4	Crecimiento del suelo no Esterilizado con el hongo <i>Thichoderma Harzianum</i> ...	66
Gráfico 6-4	Resultados de la comparación de la eficiencia	72
Gráfico 7-4	Niveles de Disminución de TPHs con la aplicación de las tres especies de hongos.....	72

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1-2	Hongo en las frutas olvidadas	19
Fotografía 1-3	Toma de muestras	27
Fotografía 2-3	Recolección de muestras	28
Fotografía 3-3	Agar Papa Dextrosa	32
Fotografía 4-3	Agar – Nutritivo (AN)	33
Fotografía 5-3	Agar – Avena (AA)	33
Fotografía 6-3	Cloranfenicol	34
Fotografía 7-3	Ketoconazol	34
Fotografía 8-3	Peso de la Avena 10 gr	36
Fotografía 9-3	Disolución de la avena	36
Fotografía 10-3	Lectura del pH	36
Fotografía 11-3	Peso del Agar PDA	37
Fotografía 12 -3	Peso del Agar Nutritivo	37
Fotografía 13-3	Proceso de Esterilización	38
Fotografía 14 -3	Peso del Suelo contaminado	38
Fotografía 15-3	Preparación de las Cajas petris	39
Fotografía 16-3	Incubación a 28°C	39
Fotografía 17-3	<i>Aspergillus niger</i>	41
Fotografía 18-3	<i>Thichoderma harzianum</i>	41
Fotografía 19-3	<i>Paecilomyces Lilacinus</i>	41
Fotografía 20-3	Sellado de las cajas	42
Fotografía 21-3	Incubación	42
Fotografía 22-3	Tubos que contienen agua destilada	44
Fotografía 23-3	Materiales a esterilización	44

Fotografía 24-3	Cajas petris para la siembra en la cámara de flujo	45
Fotografía 25-3	Colocación del Suelo no Esterilizado	45
Fotografía 26-3	Cajas petris con Suelo Esterilizado	46
Fotografía 27-3	Cajas petris con Suelo No Esterilizado.....	46
Fotografía 28-3	Especies de Hongos a utilizarse <i>Aspergillus Niger</i> , <i>Paecilomyces Lilacinus</i> y <i>Thichoderma harzianum</i>	47
Fotografía 29-3	Hongo <i>Thichoderma harzianum</i>	47
Fotografía 30-3	<i>Thichoderma Harzianum</i> dilución 10 – 1	48
Fotografía 31-3	Hongo <i>Paecilomyces Lilacinus</i>	49
Fotografía 32-3	Hongo <i>Aspergillus Niger</i>	50
Fotografía 33-3	Tubos con 9 ml de Agua destilada	50
Fotografía 34-3	<i>Aspergillus Niger</i> dilución 10 – 1.....	51
Fotografía 35-3	Peso del suelo contaminado.....	53
Fotografía 36-3	Suelo contaminado más las tres especies de Hongos	54
Fotografía 37-3	30 Cajas petris para los análisis	57
Fotografía 38-3	Utilización de 9 Muestras de suelo contaminado	58
Fotografía 39-3	Medios de cultivo	59
Fotografía 40-3	Distribución de los diferentes medios de cultivo	59
Fotografía 41-3	Muestras de suelo con la especie de Hongo <i>Aspergillus Niger</i>	60
Fotografía 42-3	Muestras de suelo con la especie de Hongo <i>Thichoderma Harzianum</i>	60
Fotografía 43-3	Muestras de suelo con la especie de Hongo <i>Paecilomyces Lilacinus</i>	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2	Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicio.....	24
Tabla 1-3	Lista de sistemas para la toma de muestras sólidas.....	27
Tabla 2-3	Profundidad de muestreo según el uso del suelo	28
Tabla 3-3	Descripción de la Parroquia San Carlos	30
Tabla 4-3	Descripción de la Metodología que se utilizó.....	31
Tabla 5-3	Detalle de los reactivos que se utilizaron	32
Tabla 6-3	Descripción del procedimiento que se empleará tanto con Suelo Esterilizado y con Suelo no Esterilizado	43
Tabla 1-4	Resultados de los Parámetros Físicos.....	62
Tabla 2-4	Resultados de los Parámetros Químicos	62
Tabla 3-4	Resultados del conteo de los microorganismos antes de los tratamientos.....	63
Tabla 4-4	Resultados del Crecimiento con la especie de Hongo <i>Aspergillus Niger</i> en Suelo Esterilizado expresado en diámetro de las colonias (cm)	63
Tabla 5-5	Resultados del Crecimiento con la especie de Hongo <i>Thichoderma Harzianum</i> en Suelo Esterilizado expresado en diámetro de las colonias (cm)	64
Tabla 6-4	Resultados del Crecimiento con la especie de Hongo <i>Paecilomyces Lilacinus</i> en Suelo Esterilizado expresado en diámetro de las colonias (cm)	65
Tabla 7-4	Resultados del Crecimiento con la especie de Hongo <i>Aspergillus Niger</i> en Suelo no Esterilizado expresado en diámetro de las colonias (cm)	65
Tabla 8-4	Resultados del Crecimiento con la especie de Hongo <i>Thichoderma Harzianum</i> en Suelo no Esterilizado expresado en diámetro de las colonias (cm)	66
Tabla 9-4	Resultados del Crecimiento con la especie de Hongo <i>Paecilomyces Lilacinus</i> en Suelo no Esterilizado expresado en diámetro de las colonias (cm)	67

Tabla 10-4	Resultados de los Controles durante el Crecimiento con las tres Especies de hongos expresado en diámetro de las colonias (cm)	67
Tabla 11-4	Resultados conteo de esporas.....	68
Tabla 12-4	Resultados de los TPHs con las tres Especies de Hongos	69
Tabla 13-4	Resultados del conteo de los microorganismos después de los tratamientos	69
Tabla 14-4	Análisis de varianza para el crecimiento de las colonias en cm de 3 especies de hongos benéficos en suelo contaminado con petróleo	70
Tabla 15-4	Prueba de Tukey para crecimiento de las colonias en cm de 3 especies de hongos benéficos en suelo contaminado con petróleo.....	71

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo A: Área contaminada
- Anexo B: Toma de muestra
- Anexo C: Toma de muestra compuesta
- Anexo D: Muestras compuestas correctamente rotuladas
- Anexo E: Hongo *Aspergillus Niger*
- Anexo F: Hongo *Thichoderma Harzianum*
- Anexo G: Hongo *Paecilomyces Lilacinus*
- Anexo H: Esporas *Aspergillus Niger*
- Anexo I: Esporas *Thichoderma Harzianum*
- Anexo J: Esporas *Paecilomyces Lilacinus*
- Anexo K: Resultados iniciales de los análisis de los TPHs
- Anexo L: Resultados de los análisis Químicos y Físicos del suelo contaminado con petróleo.
- Anexo M: Resultados finales de los análisis de los TPHs

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar la eficiencia degradativa de tres especies de hongos benéficos sobre suelos contaminados con petróleo en la parroquia San Carlos del Cantón Joya de los Sachas. La investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo con la utilización de 3 especies de hongos (*Aspergillus niger*, *Thichoderma harzianum* y *Paecilomyces lilacinus*), 2 medios de cultivos Agar Papa Dextrosa (PDA) y suelo contaminado (SC), 3 concentraciones (10^7 , 10^8 , y 10^9) y 3 repeticiones (R1, R2, R3) dando un total de 54 unidades experimentales. Se comparó su desarrollo expresado en diámetros de colonias (cm) realizado en 54 cajas petris con la utilización de Suelo Esterilizado y Suelo no Esterilizado, alcanzando un mayor crecimiento de las especies de hongos con la utilización del Suelo Esterilizado. Como resultados alcanzados de la eficiencia degradativa con las tres especies de hongos se obtuvo para *Aspergillus niger* un 37,65%, para *Thichoderma harzianum* un 32,76 % y para la especie de hongo *Paecilomyces lilacinus* un 29,59 %. El proceso desarrollado al aplicar las tres especies de hongos benéficos muestran un 100% de eficiencia en la degradación de los hidrocarburos al reducir su concentración inicial de 5080 ppm a valores < 1000 ppm, por lo cual las tres especies de hongos son altamente efectivas en la degradación de hidrocarburos generando en los habitantes de la zona un beneficio social, económico y ambiental. Concluyendo que numéricamente *Aspergillus niger* es más eficiente que *Thichoderma Harzianum* y *Paecilomyces lilacinus*. Para próximas investigaciones sobre suelos contaminados con petróleo mediante la utilización de microorganismos se recomienda realizar con diferentes especies de hongos para conocer su diferente efectividad que presentan.

Palabras clave: <TECNOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA INGENIERÍA>, <INGENIERÍA AMBIENTAL>, <SUELOS CONTAMINADOS>, <HIDROCARBUROS TOTALES DE PETROLEO (TPH)>, <HONGO (*Aspergillus niger*)>, <HONGO (*Thichoderma harzianum*)> <HONGO *Paecilomyces lilacinus*>, <BIORREMEDIACIÓN>.

SUMMARY

The objective of this research was to determine the degrading efficiency of three beneficial fungus species on oil contaminated soils in San Carlos parish, Joya de los Sachas Cantón. The research was carried out in the Biological Sciences Laboratories of the Faculty of Natural Resources of Escuela Superior Politécnica de Chimborazo with the use of 3 species of fungi (*Aspergillus niger*, *Thichoderma Harzianum* and *Paecilomyces lilacinus*), 2 culture media Potato Dextrosa Agar (PDA) and contaminated soil (CS), 3 concentrations (10^7 , 10^8 , y 10^9), and 3 replicates (R1, R2, R3) giving a total of 54 experimental units. It was compared its development expressed in colonies diameters (cm) carried out in 54 petris boxes with the use of Sterilized Soil and Non- Sterilized Soil. It achieved a greater growth of the species of fungi with the use of Sterilized Soil. As results obtained from the degradation efficiency with the three fungal species, 37.65% were obtained for *Aspergillus niger*, 32.76% for *Thichoderma harzianum* and 29.59% for *Paecilomyces lilacinus*. The process developed by applying the three beneficial fungal species shows a 100% efficiency in the hydrocarbon degradation by reducing their initial concentration of 5080 ppm to values <1000 ppm, which is why the three species of fungi are highly effective in degradation of hydrocarbons generating in the inhabitants of the zone a social, economic and environmental benefit. Concluding that numerically *Aspergillus niger*, is more efficient than *Thichoderma harzianum* and *Paecilomyces lilacinus*. For future research on soils contaminated with oil by the use of microorganisms is recommended to perform with different species of fungi to know their different effectiveness.

Keywords: <ENGINEERING TECHNOLOGY AND SCIENCES>, <ENVIRONMENTAL ENGINEERING >, <CONTAMINATED SOILS>, <TOTAL OIL HYDROCARBONS> <HONGO (*Aspergillus niger*)>, <HONGO (*Thichoderma harzianum*)> < HONGO (*Paecilomyces lilacinus*)>, <BIORREMEDIATION>.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Identificación del problema

Se ha identificado aproximadamente $10000m^3$ de suelos contaminados en la parroquia San Carlos ubicado en el Cantón Joya de los Sachas Provincia de Orellana la temperatura mínima es de $18^{\circ}C$, la normal es de $25.6^{\circ}C$ y la máxima de $42^{\circ}C$ su altitud es de 240 a 320 metros sobre el nivel del mar y una superficie de 133, 47 Km² (13.347,41ha).

La contaminación del suelo por hidrocarburos es un problema cada vez más importante por su impacto ambiental, que provoca degradación del suelo para cultivos, pérdida de sus cosechas, muerte de animales de caza y pesca y formas de vida más elementales, tales como los microorganismos que intervienen en los ciclos básicos de materia y energía además los ríos amazónicos podrían convertirse en un medio de transporte al llevar los contaminantes a otras zonas o sectores durante su trayectoria afectando a componentes bióticos, abióticos y emigrar a los lugares menos contaminados.

Este tipo de contaminación ocasiona riesgos directos a la salud humana y al entorno, además los altos costos que implican los procesos de limpieza y mitigación de los lugares afectados en especial a los pueblos alrededor de la comunidad San Carlos, y los procesos de explotación petrolera cada vez son mayores en el sector.

La contaminación de los suelos de la Amazonía han sido remediada por distintas metodologías como la biorremediación con bacterias pero no se aplicado el tratamiento fúngico.

1.2. Justificación de la investigación

En los últimos años se ha incrementado el uso de tratamientos biológicos como la biorremediación para limpiar suelos contaminados con hidrocarburos de la región amazónica, además las políticas ambientales de las industrias y empresas que generan estos pasivos ambientales se están direccionando a disminuir y mitigar los impactos ambientales provocados por la contaminación con hidrocarburos.

El presente estudio proporciona una alternativa para la recuperación de suelos contaminados, reduciendo eficientemente la toxicidad producida por el crudo y sus derivados presentes en suelos, mediante la identificación de hongos tales como *Aspergillus Niger*, *Trichoderma Harzianum* y *Paecilomyces Lilacinus* ya que estos hongos poseen un grado de degradabilidad y de compuestos orgánicos xenobióticos HAP's y encapsulamiento de los metales pesados, con lo cual se busca la eliminación parcial o total de los compuestos que causen toxicidad y se trata de obtener una viabilidad de recuperación del suelo afectado de la parroquia San Carlos ubicado en el Cantón Joya de los Sachas.

Los hongos viven de la descomposición de la materia orgánica en sus diversas formas, incluyendo la basura, hojarasca y otros sustratos, estos organismos constituyen la clave para la reincorporación de los materiales orgánicos en el suelo, favoreciendo así la formación o el enriquecimiento de tales suelos.

Se presenta como posible solución el uso de los hongos *Aspergillus Niger*, *Trichoderma Harzianum* y *Paecilomyces Lilacinus*, los mismos que tienen una importante capacidad degradativa como agente de biorremediación para contribuir la disminución de los suelos contaminados por hidrocarburos en la parroquia San Carlos.

Esta investigación contribuirá a encontrar una solución al problema de la contaminación de suelos por hidrocarburos a través de los hongos, determinando la eficiencia degradativa además contribuirá a mejorar la calidad de vida de los habitantes de la parroquia San Carlos disminuyendo la concentración de sustancias tóxicas en el entorno.

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

- Determinar la eficiencia degradativa de las especies de hongos benéficos *Aspergillus Niger*, *Thichoderma Harzianum* y *Paecilomyces Lilacinus* sobre suelos contaminados con petróleo en la parroquia San Carlos del Cantón Joya de los Sachas

1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar las características físicas, químicas y biológicas de los suelos antes de los tratamientos.
- Evaluar la eficiencia degradativa de las tres especies de hongos sobre suelo contaminado con petróleo.
- Evaluar la presencia de los agentes biológicos utilizados después de los tratamientos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

La problemática ambiental, es un tema que en los últimos años ha preocupado a los diferentes actores que trabajan extrayendo petróleo, ya que por circunstancias pasadas las grandes compañías han causado desastres de grandes magnitudes, ya que no han tomado las debidas precauciones a la hora de extraer petróleo y han contaminado grandes campos de la Amazonia Ecuatoriana.

Los daños causados por la industria petrolera, son inimaginables y difíciles de remediar por lo que esta investigación se hace muy necesaria para tratar de remediar en algo la contaminación causada por estas industrias.

Existe contaminación de suelo por la manipulación inadecuada del petróleo. Para dar solución a este problema, existen métodos de tratamiento para su recuperación, como es la técnica landfarming. Donde la presente investigación tiene como objetivo biorremediar suelo contaminado con hidrocarburo de la Central Hidroeléctrica del Campo Secoya por landfarming de la empresa Petroproducción localizada en la provincia de Sucumbíos

Para alcanzar el objetivo planteado se realizaron, 4 tratamientos con suelo contaminado, los tres primeros (TA, TB, TC) fueron tratados con nutrientes orgánicos (residuos orgánicos vegetales) y acondicionador (aserrín) y el cuarto T fue tratado como control biótico (atenuación natural). El TA se realizó con (25% MO 75% AS), TB (75% MO AS), TC (50% MO + 50% AS) para incrementar la actividad microbiana, el suelo contaminado fue distribuido en partes iguales (100%) en los sistemas de biorremediación (bioceldas).

Como resultados se obtuvo una reducción de TPH en un 72% del TB, 53% del TC y un 36% del TA en comparación con el control biótico en el cual se obtuvieron porcentajes de remoción de 10%. Los metales pesados presentaron niveles inferiores a los establecidos por la Regulación Nacional para suelos agrícolas antes y durante el tratamiento. El mejor tratamiento como

muestran los resultados es el TB obteniéndose la más alta remoción de hidrocarburo de 72% en 206 días, alcanzándose el objetivo planteado. Se recomienda la biorremediación mediante la bioestimulación ya que es un método eficiente para la biodegradación de TPH en suelos contaminados, además de la posibilidad del empleo de desechos orgánicos vegetales y lignocelulósicos lo cual implica una opción económica y factible para las condiciones del país. (Arboleada, 2008)

Investigaron la factibilidad de la biorremediación, como tratamiento opcional de suelos contaminados con hidrocarburos. Para examinar la eficiencia de la atenuación natural y bioestimulación, utilizaron un mesocosmos tanto con suelos fertilizados y no fertilizados con NPK. El nivel inicial de contaminación fue reducido aproximadamente en un 50% y 70% en suelo no fertilizado y fertilizado respectivamente.

Se observó el efecto de la bioestimulación en la biodegradación de hidrocarburos de suelo contaminado, en reactores de fase semisólida, encontrando que mediante la adición de un fertilizante, se obtenía un elevado porcentaje de degradación. El suelo tratado presentaba altos niveles de contaminación por hidrocarburos; de esta manera la bioestimulación en fase sólida puede considerarse como alternativa para la biorremediación del suelo. (Machin, 1999)

Para los investigadores de la Universidad de la Salle de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, en su investigación argumentan lo siguiente: (Benavides, 2006)

El manejo inadecuado de los materiales y residuos peligrosos ha generado a escala mundial, un problema de contaminación de suelos, aire y agua. Entre las más severas contaminaciones se destacan las que se produjeron y todavía se producen a causa de la extracción y el manejo del petróleo en todos los países productores de hidrocarburos. En nuestro país, el transporte de crudo y sus derivados se ha visto afectado considerablemente durante los últimos 18 años, por una permanente actividad terrorista contra los oleoductos e instalaciones petroleras. En el suelo los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmosfera, iniciando una serie de procesos fisicoquímicos simultáneos como evaporación y penetración, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida puede ser más o menos lentos, ocasionando una mayor toxicidad, además de tener una moderada, alta o extrema salinidad, dificultando su tratamiento. Altos gradientes de salinidad pueden destruir la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células, lo cual es letal para muchos microorganismos usados para el tratamiento de aguas y suelos contaminados. En la presente revisión se analiza la biorremediación como una alternativa “saludable” frente al deterioro progresivo de la calidad del medio ambiente por el derramamiento de crudos, ya que

la esta problemática genera una amenaza real a la salud pública, así como la extinción de gran cantidad de especies vegetales y animales.

(Silva, 2008) Aisló y seleccionó consorcios microbianos con capacidad para degradar hidrocarburos de dos fuentes: una contaminada con hidrocarburos (IMP) y otra no contaminada (composta residual). La degradación de hidrocarburos fue de 25,48% para el consorcio IMP y de 22,37%, para el consorcio de la composta.

(Santas, 1997) Indicó que los métodos analíticos para medir la biodegradación de hidrocarburos de petróleo varían en efectividad; la biodegradación in vitro varía cuando se expone al microorganismo frente a un amplio rango de contaminantes, resultando limitada; llegaron a concluir que la reintroducción de microorganismos nativos, parece ser el método de biorremediación más efectivo.

2.2. Marco Conceptual

2.2.1. Suelo contaminado

Para poder conceptualizar y dar un criterio acerca del suelo contaminado es necesario iniciar indicando varios conceptos que ayudaran no solo a aclarar el tema sino a comprender y entender y los componentes que en ella conlleva.

El suelo es un componente ambiental que por su origen, formación y evolución no puede ser aislado del entorno que lo circunda, representando, en la mayoría de ecosistemas terrestres, el medio físico-químico en el que se desarrolla la vida. (Romaniuk, 2007)

Si se observa un corte de suelo, como puede ser el borde de un camino o de una barranca, se verá que está formado por varias capas diferentes. A cada capa se le llama horizonte.

El suelo es la capa superficial de la tierra, sobre las que crecen las plantas, de él se extraen el agua y las sustancias nutritivas que les permiten crecer, y también en el mismo suelo, las raíces encuentran el aire necesario para ellos poder sobrevivir. (González, 2007)

- HORIZONTE A: Es la capa superior, más oscura, más fértil, por lo general es la capa arable
- HORIZONTE B: Es una capa más pesada, con más arcilla, menos fértil, con menos raíces.
- HORIZONTE C: Es la capa más profunda, prácticamente sin raíces.



Gráfico 1-2: El suelo

Fuente: (González, 2007)

“El suelo se puede considerar como un sistema natural desarrollado a partir de una mezcla de minerales y restos orgánicos, bajo la influencia del clima y del medio biológico” (Ruda, 2005)

2.2.2. Estructura del suelo

Por simplicidad se considera partículas esféricas con cargas superficiales negativas, compensadas por contracciones, una parte de los cuales componen la doble capa difusa.

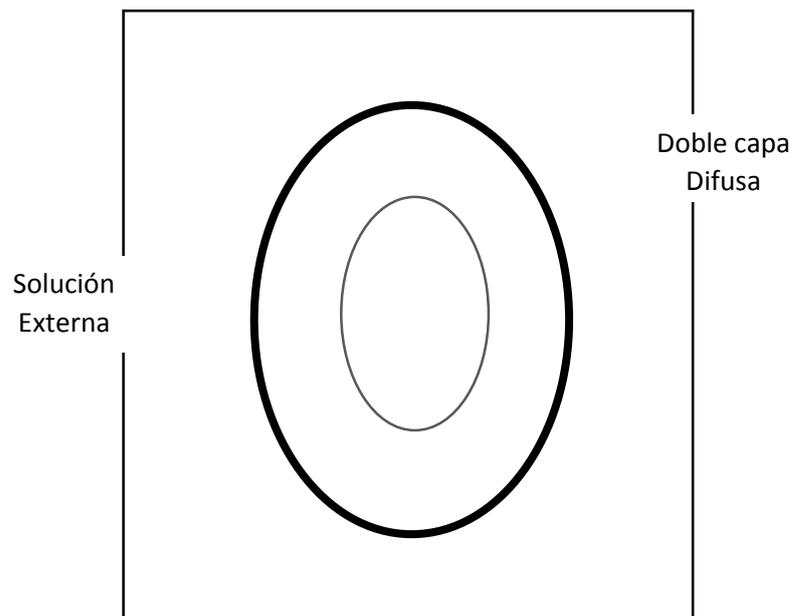


Gráfico 2-2: Estructura del Suelo

Fuente: (Ruda, 2005)

La estructura del suelo “se comprende su capacidad de descomponerse bajo condiciones naturales en agregados de diferentes tamaños y formas”

La estructura superficial y subsuperficial de los suelos tiene gran importancia ya que se interrelaciona con muchos factores indispensables para el crecimiento adecuado y desarrollo de los cultivos.

A manera de ejemplo podemos citar los factores que tienen relación con la preparación de los suelos, pues influyen en la aireación y circulación del aire por el subsuelo y por consecuencia, en el grado de mullido, la porosidad, el régimen de drenaje, la penetración del sistema radicular, entre otros. También constituye una función fundamental en la pedogénesis y nutrición de las plantas, al tener gran significado en la mejora de la fertilidad y regir la actividad microbiana de los suelos.

En la opinión de los autores de esta obra, la estructura del suelo reviste importancia desde diferentes puntos de vista:

Por ella se diagnostican los tipos de suelos, ya que cada tipo y subtipo genético tiene una estructura característica que adopto en su formación.

Cuando un suelo está bien estructurado significa que tiene una fertilidad óptima, pues tiene relación estrecha con un buen contenido en materia orgánica y actividad biológica. (Jiménez, 2010)

2.2.3. Clasificación de la Estructura del Suelo

La estructura del suelo se clasifica en:

Tipo

Expresa la forma de los agregados y se clasifican en: granulares o migajosas, bloques, prismáticas, laminar o masiva, y de las cuales, la granular es la mejor forma de los agregados por su mayor porosidad, aireación e infiltración del agua.

Clase

Expresa el tamaño de los agregados y se clasifica en muy fina, fina, media, gruesa, muy gruesa según la escala dada en milímetros (mm) y que va de menos uno a más de diez milímetros.

Grado de desarrollo

Resistencia de los agregados a ser destruidos bajo presión y se clasifican en fuerte, débil y moderado. (Arias, 2001)

Entonces se entiende por suelo contaminado todo aquel sitio cuyas características tanto: físicas, químicas, o biológicas han sido alteradas negativamente por la presencia de componentes de carácter peligroso, en concentraciones tales que representan un riesgo para la salud humana o el medio ambiente. Según muchos organismos internacionales (EPA Australia, Environmental Agency UK, entre otras), aquel que represente una amenaza para la salud humana y el medio ambiente, debido a las sustancias presentes en el suelo o bajo de éste, generalmente debido a un mal uso previo.

Esto se genera por las diferentes actividades ya sean agrícolas, industriales y humanas por su inadecuada gestión, tanto de materia orgánica, solventes o residuos peligrosos, perjudicando a su vez cualquier actividad posterior relacionada con este recurso, traduciéndose finalmente en un problema mundial de contaminación de los suelos. (Jaramillo, 2005)

Por lo tanto cualquier suelo contaminado puede provocar daños a los seres vivos que en él se encuentran y al medio ambiente en general. Entonces el suelo es, por principio, el sitio donde van a parar gran parte de los desechos sólidos y líquidos de cualquier actividad humana. Indicando, no obstante, que los suelos es también el receptáculo de los desechos no deseables de origen geológico, por ejemplo, de las aguas ácidas con metales pesados provenientes de mineralizaciones sulfuradas aflorantes.

2.2.4. La contaminación

La contaminación es la introducción de sustancias en un medio provocando que este sea inseguro o no apto para su uso. Por ende la contaminación es uno de los problemas principales que hoy enfrenta el Planeta Tierra en uno de sus componentes más importantes el suelo. (Campos, 2008)

Existen dos tipos de contaminación que repercuten o influyen en la formación y estructura del suelo: contaminación natural llamada endógena que son los diferentes fenómenos naturales que contaminan el suelo como por ejemplo un volcán activo capaz de aportar mayores cantidades de sustancias externas y contaminantes que varias centrales térmicas de carbón juntas; y la contaminación antrópica que es totalmente exógena que es causada principalmente por actividades humanas.

Las primeras manifestaciones de contaminación antrópica pudieron causar efectos similares a los de otras causas naturales. Así, en las primeras culturas sin duda el fuego, que fue un

elemento clave para el desarrollo de las mismas, permitió modificar la organización espacial del suelo.

Esta degradación del medio ambiente por un contaminante externo puede provocar daños en la vida cotidiana del ser humano y alterar las condiciones de supervivencia de la flora y la fauna.

Algunas fuentes de información indican que parte de esta contaminación es creada por las personas de bajos recursos, ya que en sus casas no se asignan un lugar adecuado para realizar sus necesidades, es por eso que lo realizan en tierras cerca de los hogares, causando así enfermedades y tierras degradadas.

Probablemente la gran mayoría de las personas en alguna ocasión se han hecho esta pregunta. Del por qué existe la contaminación, cabe indicar que se da este factor porque son creados por los seres humanos, dichos factores alteran negativamente el estado natural que posee el medio ambiente y como consecuencia trae cambios dañinos para la salud.

Tipos de contaminación

Existen varios grupos entre ellos se encuentra:

- **Contaminación del Agua:** Es la incorporación al agua de materias extrañas, como microorganismos, productos químicos, residuos industriales, y de otros tipos o aguas residuales. Estas materias deterioran la calidad del agua y la hacen inútil para los usos pretendidos.

- **Contaminación del Suelo:** Es la incorporación al suelo de materias extrañas, como basura, desechos tóxicos, productos químicos, y desechos industriales. La contaminación del suelo produce un desequilibrio físico, químico y biológico que afecta negativamente las plantas, animales y humanos.

- **Contaminación del Aire:** Es la adición dañina a la atmósfera de gases tóxicos, CO, u otros que afectan el normal desarrollo de plantas, animales y que afectan negativamente la salud de los humanos



Gráfico 3- 2: Tipos de contaminación

Fuente: (Vanegas, 2009)

Otras perturbaciones medioambientales graves relacionadas con los fenómenos de contaminación son:

- ✓ Los escapes radiactivos
- ✓ El smog
- ✓ La lluvia ácida
- ✓ Los gases de efecto invernadero
- ✓ Las mareas negras
- ✓ Destrucción de la capa de ozono.

Es necesario hacer conciencia y aportar más para evitar la contaminación ya que es un problema que concierne a todos y al mismo tiempo perjudica. La contaminación es la introducción de agentes biológicos, químicos o físicos a un medio al que no pertenecen.

La contaminación afecta a todo el planeta, tanto a los seres humanos, como al resto de los seres vivos.

La contaminación del agua, del suelo y del aire perjudica de forma seria la vida de muchos animales en vías de extinción y de una gran variedad de plantas.

Encontrar soluciones a la contaminación del planeta es tarea de todos. Empezar reciclando en los hogares, en las oficinas, en las empresas y en la calle, lo más práctico que podemos hacer para que esto cambie es:

- Utilizar productos biodegradables
- Reciclar los materiales más contaminantes.
- No realizar actividades que dañen al medio ambiente
- Mantener un control en el uso de pesticidas y fertilizantes.
- Usar más la bicicleta y menos el coche

La humanidad tiene muchas razones para cuidar el medioambiente y frenar los graves efectos de la contaminación.

2.2.5. Causas del Suelo Contaminado

La contaminación del suelo supone la alteración de la superficie terrestre con sustancias químicas que resultan perjudiciales para la vida, pero sabemos muy claro que el principal actor para que esto suceda es el ser humano de desechos que incluso las aguas superficiales e incluso de la liberación en las chimeneas de partículas tóxicas que se depositan en el suelo después de estar suspendidas en el aire. (Macas, 1994)

Existen dos causas principales de contaminación del suelo, las provocadas por el hombre tendríamos que evitarlas para no causar tantos problemas ambientales y que las futuras generaciones vivan en un mundo mejor, estas son:

- Las provocadas por el hombre
- Las naturales

➤ Causas Provocadas por el Hombre

Las causas provocadas por el hombre, es el factor que más ha contribuido con la contaminación del suelo. Estas son las siguientes:

Por dos componentes principales: destrucción o modificación del ambiente y contaminación. En las primeras etapas del proceso de alteración ambiental, la polución no tuvo mayor trascendencia, debido a que el hombre todavía no tenía el desarrollo tecnológico muy grande y a que la población mundial era relativamente baja. (Fournier, 2005)

Es por esta razón que como primera instancia la destrucción, contaminación del suelo es por acción del hombre y sus múltiples actividades como:

- Actividad Industrial
- Actividad Agrícola
- Eliminación de Residuos
- Deforestación

Entonces las diferentes actividades del hombre dan origen con frecuencia a la contaminación del suelo.

La contaminación que causa el hombre que por su actividad para poder tener ingresos económicos se ha generado “ha logrado desaparecer la extinción de especies, así para convertir el agua, aire o alimento en tóxicos para ser humano” (Campos, 2008)

➤ **Causas de Origen Natural**

Un suelo contaminado de origen natural, es aquel que ha superado su capacidad de amortiguación para una o varias sustancias y, como consecuencia, pasa de actuar como un sistema protector a ser una causa de varios problemas. Al mismo tiempo la acumulación de compuestos naturales en el suelo debido a desequilibrios generados por las precipitaciones del agua y las deposiciones atmosféricas, todos esos componentes causan cambio en sus propiedades químicas, físicas y biológicas producidas por causas naturales como:

- Los incendios forestales que pueden acumular excesos de sustancias no biodegradables que afecten al suelo.
- Las erupciones volcánicas, los terremotos
- El agua salada, a veces el viento puede vaporizar agua con altas concentraciones de sal en zonas cercanas al mar (Pilar, 2013)

2.2.6 Petróleo

El petróleo es un líquido oleoso bituminoso de origen natural compuesto por diferentes sustancias orgánicas. También recibe los nombres de petróleo crudo, crudo petrolífero o simplemente “crudo”. Se encuentra en grandes cantidades bajo la superficie terrestre y se emplea como combustible y materia prima para la industria química.

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos (compuestos orgánicos que contienen sólo carbono e hidrógeno), pequeñas cantidades de agua, compuestos orgánicos que contienen azufre y nitrógeno, así como también compuestos metálicos tales como vanadio y níquel. (Borgna, 2001)

El petróleo, bajo la forma de bitumen, la forma artesanal más accesible, hace su aparición en la historia desde el Neolítico, como una sustancia de utilidad excepcional para la humanidad.

El petróleo era utilizado en la prehistoria de diferentes formas como por ejemplo, los fenicios lo utilizaban para sellar los cascos de sus navíos, para pegar pedazos de cerámica, la arca de Noé fue sellada con bitumen, también se utilizó como medicamento, purgaba, servía para limpiar heridas y se usaba en tratamientos de reumatismo, lepra leucemia.

El petróleo, oro negro que no se produce, sino que se extrae, se transporta y se quema sin duda en la actualidad se ha convertido en el factor de desarrollo de los países industriales, se visualiza como una fuente inagotable de riquezas. (Zabala, 2005)

Por lo tanto en el mundo se conoce cerca de 250 cuencas petroleras, las cuales contiene más de 50 mil yacimientos de petróleo y gas, es por eso las sociedades industriales modernas lo utilizan sobre todo para lograr un grado de movilidad por tierra, mar y aire impensable hace sólo 100 años. (Gerardo, 2005)

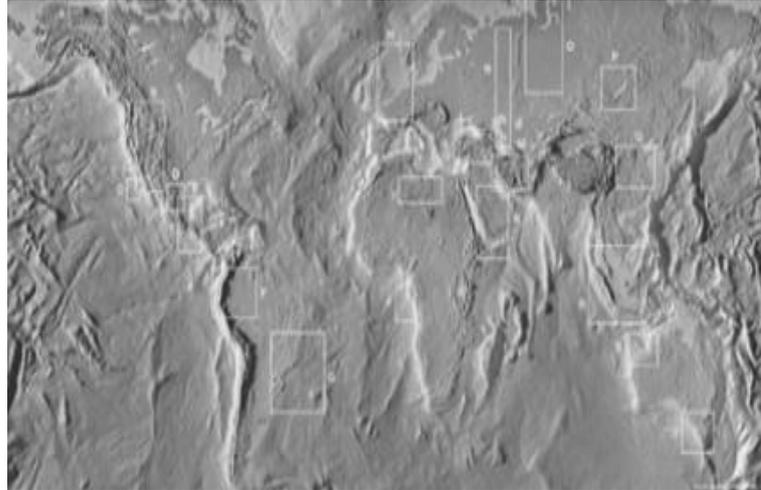


Gráfico 4-2: Cuencas Petrolíferas

Fuente: (Parra, 2003)

“La actividad petrolera ha provocado daños ambientales y sociales, externalidades locales y globales en desarrollo económico”. (Fontaine, 2004)

El petróleo, al igual que otros recursos naturales, ha ido cambiando en su importancia, en su explotación y en su uso a través de la historia y del espacio. Es decir, ni siempre ha sido un recurso básico, ni siempre ha sido explotado, ni su uso ha sido el mismo en todas las etapas de la humanidad y por todos los pueblos del mundo.

La importancia del petróleo es muy grande para la sociedad actual. Pensar en qué sucedería si se acabara repentinamente, lleva a la conclusión de que se trataría de una verdadera catástrofe: ya que los aviones, los automóviles y autobuses, gran parte de los ferrocarriles, los barcos, centrales térmicas, muchas calefacciones, dejarían de funcionar porque todo está girando alrededor del mismo.

Además, los países dependientes del petróleo para sus economías entrarían en bancarrota. “es un recurso natural no renovable que aporta el mayor porcentaje del total de la energía que se consume en el mundo.” (Serrat, 2002)

Uso del petróleo

El petróleo es, hoy en día, uno de los principales recursos energéticos. El problema de este combustible fósil es que es una fuente de energía no renovable, debido a su largo proceso de formación y a la sobreexplotación que hay actualmente.

El petróleo es un recurso no renovable y extremadamente concentrado en algunas zonas del mundo. A pesar de las crisis del petróleo de los años setenta, su uso masivo no ha dejado de crecer como tendencia y la extrema dependencia no sólo afecta a los países más ricos sino también de forma creciente a China, India. Según lo indica (Tello, 2007)

El petróleo se utiliza mayormente como combustible, es decir, la gasolina de los carros, y también para la fabricación de plásticos y envasados. No obstante, tiene otros muchos usos, como en la alimentación, agricultura o en la construcción como de carreteras.

El uso histórico de las fuentes de energía más baratas y concentradas, como el petróleo, es una de las causas más directas del crecimiento económico y aún más importante, mejora considerablemente la condición humana.

En pocas palabras, mejores fuentes de energía aumentan la productividad, cualquiera que esta sea.

Y el petróleo es, en su máxima expresión, energía de alta calidad. Es líquido, lo que lo hace fácil de mover y almacenar. Es estable y libera una gran cantidad de energía. También es mucho, mucho más limpio que el carbón. Si no fuera por las emisiones de CO₂ que genera, el petróleo y el gas serían una fuente de energía casi perfecta. A pesar de ello, el petróleo es riqueza para cualquiera que lo utilice.

Las restricciones en el uso del petróleo dependían de la capacidad de uso y de la capacidad de compra. El mundo se fue estratificando, los países ricos desplegaron la industrialización y se diferenciaron rápidamente del resto del mundo; los países pobres no tenían una industria sedienta de energía. Ni disponían de divisas para la compra. (Zabala, 2005)

2.2.7. Hongo *Aspergillus Niger*

Dentro del género *Aspergillus*, se encuentra los “*Aspergillus Niger*” descubierto inicialmente por el biólogo Italiano Pier Antonio Micheli, existen cientos de especies cuyo hábitat natural son el heno y el compostaje.

Aspergillus Níger, es el hongo filamentoso que produce un moho negro en varios vegetales, muy común en la lechuga, el tomate o la acelga y limón. Curiosamente se encontraron sus esporas en la comida, en la ropa, en las flores y en viejas tumbas.



Gráfico 5-2: *Aspergillus Niger*

Fuente: (Nishimura, 2015)

No se le considera como hongo común de almacén, sino más bien un microorganismo que coloniza productos que se encuentran en avanzado estado de deterioro. Requiere que los productos tengan contenidos de humedad relativas del 90-95% (actividad de agua de 0.90-0.95) así lo explica (Moreno, 1988)

”Añadiendo que no se lo considera hongo toxígeno, aun cuando bajo condiciones de laboratorio produce ácido oxálico y malformina que son tóxicos, las colonias son negras o cafés oscuras”. (Toreillo, 2002)

Aspergillus “es un hongo filamentoso saprofita que desempeña un papel esencial en la degradación de la materia orgánica. Su hábitat natural es el suelo donde sobrevive y se desarrolla sobre esta materia en descomposición”. (López, 2016)

“*Aspergillus* es uno de los principales hongos productores de micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos y secretados por el hongo durante el proceso de degradación de la materia orgánica, como mecanismo de defensa frente a otros microorganismos”

Es uno de los hongos más abundantes en la naturaleza. Se puede encontrar en cualquier ambiente, incluido el hospitalario: suelo, vegetación en descomposición, material de construcción, polvo doméstico, etc

Aspergillus es de los hongos más ubicuos y omnívoros que hay, con un gran arsenal enzimático, cosmopolita, y con gran cantidad de especies saprobias, algunas parásitas de vegetales, animales y humanos, y otras de importancia industrial. Varias especies son toxígenas de gran interés en salud pública. (Toreillo, 2002)

Un lugar común donde puede encontrar Aspergillus creciendo es en el abono o en las hojas caídas, ya que los Aspergillus crecen bien en la vegetación en descomposición. Los Aspergillus también crecen en las plantas y árboles que aún viven y en los alimentos con almidón como las patatas y el pan, que con frecuencia pueden estimular el crecimiento de los Aspergillus.

Los Hongos Aspergillus tiene síntomas variados, estos hongos están por todas partes y aunque constantemente se respiran las esporas de los Aspergillus, por lo general no está en cantidades suficientemente altas para afectar a nuestra salud. Sin embargo, si una persona está respirando una cantidad mucho mayor de lo normal de esporas de los Aspergillus, esto sucede cuando estos están creciendo en la casa de una persona, entonces puede sufrir los síntomas negativos en la salud, y programar enfermedades.

“Los cultivos y alimentos como el maní y el maíz están a menudo contaminados por el hongo Aspergillus y esto hace que las mico toxinas estén presentes. Hay límites de seguridad establecidos por la cantidad de aflatoxinas permitidas en los alimentos“. (Mendéz, 2002)

Características:

- ✓ Macroscópicas.- Tiene al principio un fondo amarillento y con el paso de los días presenta cabezas conoidales negras o negras grisáceas, negro carbón con apariencia algodonosa, quedando marcada una gruesa capa de color blanco que rodea a conidios de color oscuro en su interior

- ✓ Microscópicas.- Los conidióforos son de pared lisa, hialina o pigmentada que pueden medir entre 1,5-3 mm de largo, poseen una vesícula globosa y produce fialides a su alrededor de donde brotan los conidios que son rugosos y globosos cuyo color va desde marrón a negro. (Allejo, 2010)

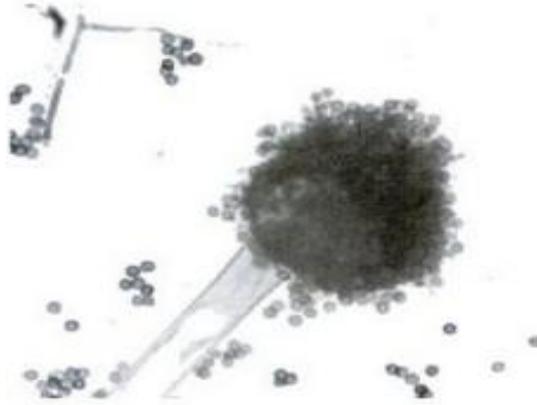


Gráfico 6-2: Estructura *Aspergillus Niger*

Fuente: (Koneman, 2006)

La correcta clasificación requiere conocimientos de micología, el estudio de los hongos, ya que hay cientos de especies de hongos *Aspergillus*. Hay varios métodos de identificación, con mayor disponibilidad a partir de la década del 2000 debido a los avances en biotecnología.

2.2.7.1 Usos del Hongo *Aspergillus Niger*

Aspergillus Niger es un hongo común que se puede encontrar en casi todos los ambientes.

Mientras que la mayoría de los suplementos probióticos consisten en bacterias útiles, algunas especies de la familia de hongos *aspergillus* se consideran probióticas, así, porque pueden impartir efectos beneficiosos.

Se ha descubierto que *Aspergillus Niger* es beneficioso para los seres humanos y los animales cuando se mantiene en el equilibrio correcto dentro del tracto gastrointestinal. Cuando se combina con otros probióticos en la proporción correcta, funciona de manera simbiótica para crear resultados óptimos. (Vega, 2002)

Como una ayuda de este hongo es la digestión, las enzimas trabajan para descomponer las proteínas y los azúcares en nuestro sistema.

Se dice también que *Aspergillus Niger* es un hongo común que se encuentra en los vegetales en descomposición y de productos alimenticios, a este hongo se lo conoce comúnmente moho negro y produce en frutas y vegetales viejos como se observa en el siguiente gráfico.



Fotografía 1-2: Hongo en las frutas olvidadas

Fuente: (Devaney, 2010)

“Debido a su color oscuro característico y su resistencia a los tratamientos antifúngicos, el *Aspergillus Niger* es utilizado comúnmente en su forma natural no fermentada, para evaluar la efectividad de los conservantes alimentarios en la prevención de la formación de mohos.” (Mendéz, 2002)

Taxonomía

- ✓ Reino: Fungi
- ✓ División: Mycota
- ✓ Subdivisión: Eumycota
- ✓ Clase: Deuteromyces
- ✓ Orden: Eurotiales
- ✓ Familia: Eurotiaceae (Guarro, 2011)

Ciclo de Vida

El género *Aspergillus* presenta una fase imperfecta o conoidal y aun no se conoce la fase ascógena o perfecta (fase sexual).

Los conidios contienen núcleos mitóticos y su pared celular es una simple modificación. Sus hifas vegetativas tabicadas crecen en el sustrato o por encima del mismo, a intervalos la célula se ramifica y extiende al aire, las hifas o conidióforos fecundos cuyo extremo aumenta de tamaño para formar vesículas en donde están dispuestos de manera radial numerosos esterigmas y cada uno de estos sustenta una cadena de conidios. (Surrey, 1999)

La producción industrial principal del *Aspergillus Niger* está enfocada a la conservación de alimentos. Debido a que es un agente de fermentación, puede someterse a un proceso químico que lo hace un polvo que se usa en la conservación de alimentos.

Al igual que el jugo de limón o de lima pueden evitar que una manzana o un aguacate se oscurezcan en presencia del oxígeno, el *Aspergillus Niger*, que se encuentra en el jugo cítrico, puede ayudar a preservar la comida embotellada y enlatada. (García, 2016)

El *Aspergillus Niger* también puede causar graves infecciones es decir varias patologías como si al oído se acumula muchas esporas de moho se alojan en el canal auditivo. Puede encontrarse en otros sitios húmedos del cuerpo humano.

Los *Aspergillus* se los consideraba peligrosos. Esto se debe a que se trata de un hongo ampliamente difundido en la naturaleza, que se desarrolla en vegetales en descomposición, granos de cereal, heno, tejidos de algodón y lana y en plumas, siendo su medio ideal los ambientes oscuros, húmedos y cerrados.

2.2.8 Hongo *Trichoderma Harzianum*

Las especies de *Trichoderma* son hongos que aparecen en cualquier tipo de suelo, produciendo colonias blancas, amarillas o más típicamente verdes cuando se cultivan.

Generalidades

El *Trichoderma* es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios. Pertenece a la subdivisión Deuteromycetes que se caracterizan por no poseer, o no presentar un estado sexual determinado. De este microorganismo existen más de 30 especies, todas con efectos benéficos para la agricultura y otras ramas (Méendez, 2007)

Por lo tanto el *Trichoderma* es un hongo que se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios

“El hongo *Trichoderma Harzianum* es un antagonista natural del suelo, que ha sido probada y usada con indiscutibles éxitos bajo diferentes formas de aplicación, este hongo representa una alternativa potencial como componente de manejo”. (Gutiérrez, 2003)

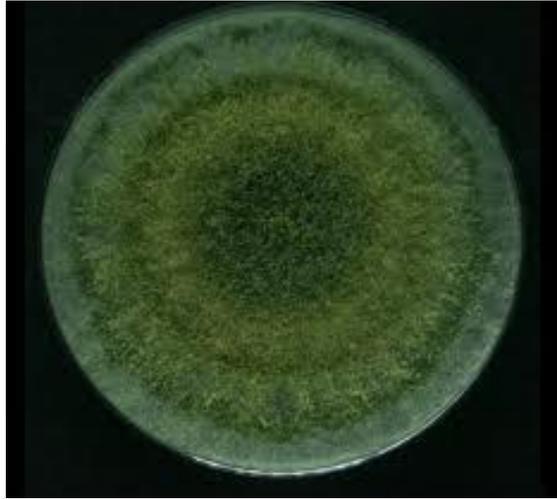


Gráfico 7-2: *Trichoderma Harzianum*

Fuente: (Motavaracha Surat, 2002-2004)

Características

El *Trichoderma* probablemente sea el hongo beneficioso, más versátil y polifacético que abunda en los suelos. No se conoce que dicho microorganismo sea patógeno de ninguna planta; sin embargo, es capaz de parasitar, controlar y destruir muchos hongos, nemátodos y otros fitopatógenos, que atacan y destruyen muchos cultivos; debido a ello, muchos investigadores le llaman el hongo hiperparásito. Ello convierte al *Trichoderma* en un microorganismo de imprescindible presencia en los suelos y cultivos, y de un incalculable valor agrícola. (Méndez, 2007)

Este hongo crece y se ramifican típicas hifas que pueden oscilar entre 3 y 12 cm de diámetro, según las condiciones del sitio en donde se esté reproduciendo. La esporulación asexual ocurre en conidios unicelulares de color verde generalmente tienen 3 a 6 m de diámetro.

Entre las principales características podemos citar:

- Es fácil de aislar
- Presenta crecimiento y reproducción rápidos
- Ataca a un amplio rango de patógenos
- Promueve el crecimiento vegetal, al producir sustancias promotoras de crecimiento

Taxonomía

La clasificación taxonómica del hongo *Trichoderma harzianum* es la siguiente:

- ✓ Reino: Fungi

- ✓ División: Ascomycota
- ✓ Orden: Eurotiales
- ✓ Familia: Hypocreaceae
- ✓ Género: Trichoderma
- ✓ Especie: harzianum

El uso de *Trichoderma* como biocontrol en manejo integrado de enfermedades es la mejor forma de aprovechar las capacidades de este microorganismo como agente antagónico.

“Actualmente está comprobado su efecto contra patógenos y como promotor de crecimiento. Sin duda su utilización ayudará a una agricultura sustentable y representa un ahorro de insumos para el productor hortícola.” (Martínez, 2001)

2.2.9 Hongo *Paecilomyces Lilacinus*

Las especies de *Paecilomyces* se han aislado a partir de suelo, restos vegetales, y frutas. Usualmente es considerado como contaminante, pero se ha aislado como agente de hialohifomicosis.

Es el enemigo natural de muchos géneros de nematodos y algunos insectos como moscas blancas y chinches, “el hongo parasita los huevos y hembras de los nematodos con la participación de enzimas líticos causando deformaciones, destrucción de ovarios y reducción de la eclosión.” (García, 2016)

Para determinar la eficacia de este hongo como agente controlador biológico se colocaron muestras de huevos que contienen diversos medios de cultivos inoculados en los hongos. Los resultados indicaron que *Lilacinus* infecto los huevos en un término de cinco días y destruyó el embrión. El porcentaje de infección en los huevos está directamente correlacionado con el tiempo que estos están expuestos. (Cedeño, 2004)



Gráfico 8-2: Hongo *Paecilomyces Lilacinus*

Fuente: (Gefor, 2011)

Ventajas del Hongo *Paecilomyces Lilacinus*

Por ser un regulador natural, mantiene las poblaciones de nemátodos a niveles que no causan daño económico.

La presencia de nematodos es cada vez menor debido al trabajo progresivo de los microorganismos.

Si se regulan los nemátodos con formulaciones a base de *Paecilomyces Lilacinus*, se necesitan menos aplicaciones, pues se conservan y restablecen el balance natural del ecosistema.

No afecta parásitos y depredadores (Biologicos) los hongos *Paecilomyces Lilacinus* se resume en lo siguiente.

- No contamina el ambiente.
- No es toxico en humanos, animales y plantas.
- Al establecerse en el campo constituye un reservorio benéfico de inculo.
- Puede usarse en la agricultura orgánica y convencional.
- Puede aplicarse con insecticidas, fertilizantes foliares, bactericidas; algunos funguicidas sistémicos y cobres.

Es utilizado para el control de los diferentes tipos de Nematodos fitopatógenos, el hongo es capaz de penetrar el huevo, crecer dentro del mismo y destruir el embrión.

Taxonomía

- ✓ Reino: Fungi
- ✓ Clase: Sordariomycetes

- ✓ Orden: Hipocreales
- ✓ Género: Paecilomyces
- ✓ Especie: P. lilacinus

2.2.10. Marco legal

2.2.10.1 Reglamento de Operaciones Hidrocarburíferas del Ecuador (RAOHE)

El presente Reglamento tiene por objeto regular las actividades hidrocarburíferas de exploración, desarrollo y producción, almacenamiento, transporte, industrialización y comercialización de petróleo crudo, derivados del petróleo, gas natural y afines, susceptibles de producir impactos ambientales en el área de influencia directa, definida en cada caso por el Estudio Ambiental respectivo. (RAOHE, 2001)

Tabla 1-2: Tabla 6 (RAOHE) Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicio.

PARÁMETRO	EXPRESADO EN	UNIDAD	USO AGRÍCOLA	USO INDUSTRIAL	ECOSISTEMAS SENSIBLES
Hidrocarburos totales	TPH	mg/kg	< 2500	< 4000	< 1000
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)	C	mg/kg	< 2	< 5	< 1
Cadmio	Cd	mg/kg	< 2	< 10	< 1
Níquel	Ni	mg/kg	< 50	< 100	< 40
Plomo	Pb	mg/kg	< 100	< 500	< 80

Fuente: (RAOHE, 2001)

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

CAPITULO III

METODOLOGÍA

3.1. Hipótesis y especificación de variables

3.1.1. Identificación de variables

VARIABLES DEPENDIENTES
- Masa fúngica del hongo <i>Aspergillus Niger</i>
- Masa fúngica del hongo <i>Thichoderma Harzianum</i>
- Masa fúngica del hongo <i>Paecilomyces Lilacinus</i>
- Población microbiana
- Concentración de Hidrocarburos

VARIABLES INDEPENDIENTES
- Humedad
- Temperatura
- Cantidad de Sustrato
- pH

3.1.2. Hipótesis

3.1.2.1. Hipótesis General

La determinación de la eficiencia de las tres especies de hongos benéficos sobre los suelos contaminados con petróleo, contribuirá a la disminución de los problemas ambientales ocasionados en la parroquia San Carlos del Cantón Joya de los Sachas.

3.2. Tipo y diseño de la investigación

La investigación es de tipo correlacional ya que a través de las variables planteadas se va a verificar o medir el grado de relación que existe entre las variables.

La investigación tiene un diseño experimental ya que ejecuta técnicas de laboratorio, este diseño permite la manipulación de una o más variables vinculadas en relación a la variable de interés.

3.3. Unidad de análisis

La unidad de análisis para esta investigación es de 1kg de suelo contaminado para cada tratamiento a desarrollarse.

3.4. Población de estudio

La población de estudio es el área que está contaminada en la parroquia San Carlos la misma que abarca una extensión de aproximadamente $10000m^3$

3.5. Tamaño de la muestra

Las muestras que se recolectaron fueron aproximadamente 66 libras de suelo contaminado con petróleo, con la cual se realizarán los respectivos análisis en el laboratorio.

3.6. Selección de muestra

3.6.1. Toma de muestra y caracterización del suelo

El muestreo empleado para esta investigación fue por calicatas debido a la inspección directa del suelo que se desea estudiar.

Tabla 1-3: Lista de sistemas para la toma de muestras sólidas

SISTEMA	APLICACIÓN AL DISEÑO DE MUESTREO	VENTAJAS Y DESVENTAJAS
CALICATAS	Suelo de superficie suave, con profundidad de 0a 100 cm	Barato; fácil para usar, capacidad de profundidad limitada
SONDEOS MANUALES	Suelo duro, con profundidad de 0a 100 cm	Relativamente fácil de usar; capacidad de profundidad limitada; costos bajos
ZANJAS	Todo tipo de suelo, hasta 4m	Fácil de usar, capacidad de profundidades limitada, requiere del uso de retroexcavadoras
SONDEOS LINES	Suelo arenoso, hasta 20m	Buen rango de profundidad; calificado para el muestreo de suelos con contaminantes volátiles
SONDEOS SEMIME CÁNICO	Suelo rocoso o arenoso, hasta 10m	Buen rango de profundidad; puede requerir de dos o más operadores; costos medios
SONDEOS MECÁNICOS	Todo tipo de suelo, grandes profundidades	Buen rango de profundidad, generalmente usado para ganar acceso a horizontes de suelo más profundos; requiere de mano de obra experimentada, costo más elevado

Fuente: Guía sobre suelos contaminados, gobierno de Aragón, 2004, adaptado

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

La toma de muestras se realizó en la parroquia San Carlos del Cantón Joya de los Sachas la cantidad de muestra a tomar fue de acuerdo a la cantidad de suelo afectado la misma que abarca una extensión de $10000m^3$

- Se realizó un recorrido y verificación del terreno para evitar cualquier sustancia o elemento que puedan impedir al momento de realizar el muestreo.
- Se realizaron aproximadamente 15 calicatas en secuencia de zigzag



Fotografía 1-3: Toma de muestras

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- Los análisis, se determinaron en base al sistema de calidad para los suelos agrícolas y en relación a la tabla 6 RAOHE 1215

Tabla 2-3: Profundidad de muestreo según el uso del suelo

Usos del suelo	Profundidad del muestreo (capas)
Suelo Agrícola	0 – 30 cm (1) 30 – 60 cm
Suelo Residencial / Parques	0 – 10 cm (2) 10 – 30 cm (3)
Suelo comercial /Industrial /Extractivo	0 – 10 cm (2)

Elaborado: Loayza Fernanda, 2017

- Las muestras obtenidas se procedió a colocar en fundas ziploc y se guardaron en un cooler para posteriormente ser trasladadas al laboratorio de análisis y evaluación ambiental (AQLAB)



Fotografía 2-3: Recolección de muestras

Elaborado: Loayza Fernanda, 2017

3.7. Técnicas de recolección de datos

3.7.1. Lugar

La parroquia San Carlos, está ubicada al Sur del Cantón Joya de los Sachas, Provincia de Orellana se encuentra en las coordenadas X= 290461 Y= 9958006 ubicada aproximadamente a 11Km, de la cabecera cantonal de La Joya de los Sachas, al centro poblado de San Carlos.

Compuesta principalmente por 25 comunidades y una población de 2846 habitantes, es en un 70% zona petrolera, el resto de la población se dedica a ganadería y agricultura.

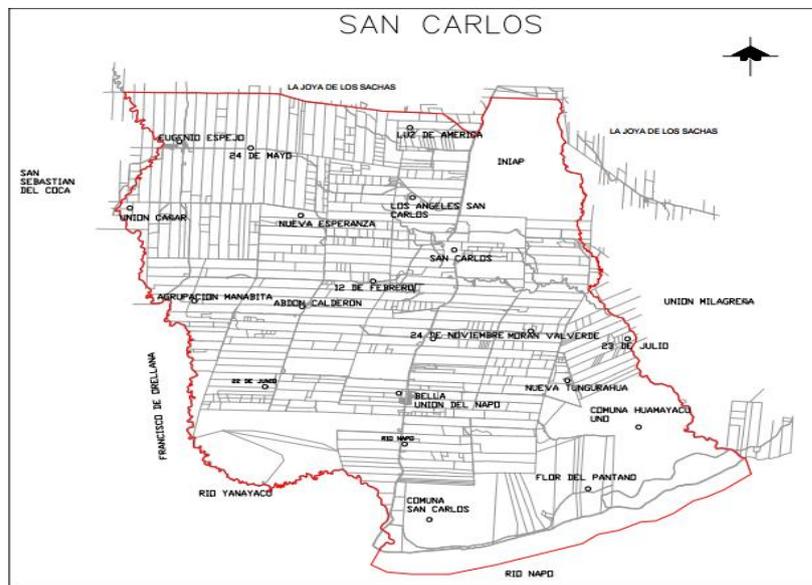


Gráfico 1-3: Mapa de la Parroquia San Carlos
Fuente: Plan de desarrollo Joya de los Sachas

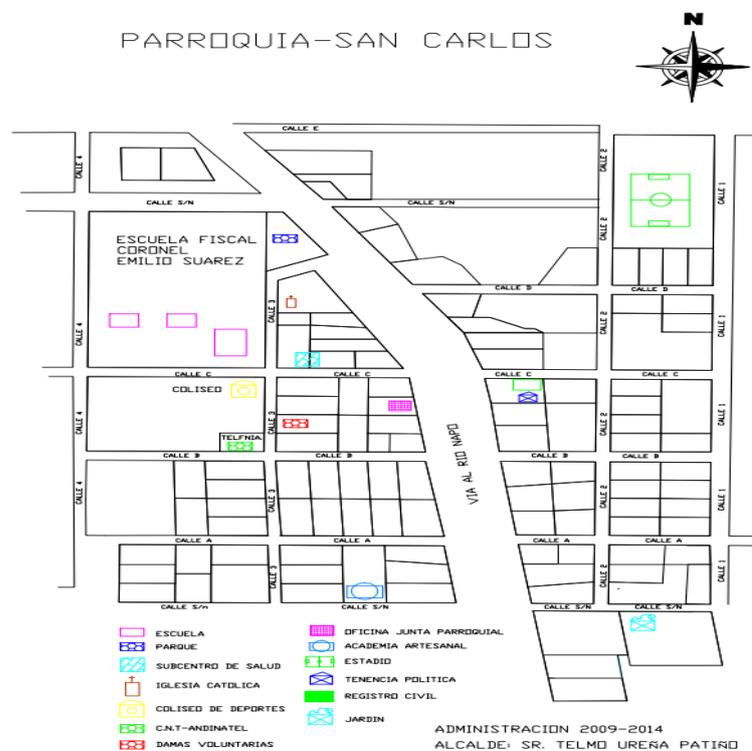


Gráfico 2-3: Parroquia San Carlos
Fuente: Administración 2009 - 2014 Joya de los Sachas

3.7.2. Ubicación

Se encuentra ubicada en 0 grados, 34 minutos y 0 segundos de latitud sur y en 77 grados, 52 minutos y 0 segundos de longitud occidental.

Tabla 3-3: Descripción de la Parroquia San Carlos

Ubicación	Sur del cantón Joya de los Sachas
Creación	9 de Agosto de 1988, Festividades de Parroquialización
Límites	Norte: Cabecera Cantonal de la Joya de los Sachas Sur: Río Napo, Cantón Francisco de Orellana y Parroquia San Sebastián del Coca Este: Cabecera cantonal de la Joya de las Sachas y parroquia Unión Milagrera Oeste: Parroquia San Sebastián del Coca.
Superficie	133.47 km ² equivalente a 13.347,41ha
Altitud	Es de 240 a 320 metros sobre el nivel del mar.

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

3.7.3. Diseño aplicado

Diseño completamente al azar (DCA) análisis factorial, este diseño consiste en la asignación de los tratamientos en forma completamente aleatoria a las unidades experimentales, este diseño es apropiado para experimentos de laboratorio.

3.7.4. Lugar de la investigación

El presente trabajo de Investigación correspondientes a los análisis de los parámetros Físicos, Químicos y Microbiológicos se realizó en el laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo “ESPOCH”.

Los análisis correspondientes a los TPHs se realizaron en los laboratorios de AQLAB en Puerto Francisco de Orellana.

3.8. *Proceso experimental*

Tabla 4-3: Descripción de la Metodología que se utilizó

HONGOS	MEDIO DE CULTIVO	CONCENTRACIÓN	Nº REPETICIONES
<i>Aspergillus Niger</i>	PDA	3	3
	SUELO CONTAMINADO	3	3
<i>Thichoderma Harzianum</i>	PDA	3	3
	SUELO CONTAMINADO	3	3
<i>Paecilomyces Lilacinus</i>	PDA	3	3
	SUELO CONTAMINADO	3	3

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

3.8.1 *Identificación y conteo de los microorganismos en el suelo contaminado con petróleo antes de los tratamientos*

REACTIVOS

Los reactivos químicos que se utilizaran, son los siguientes conociendo de estos sus características y conformación distinta, cada reactivo cumplirá una función específica dentro de la investigación:

Tabla 5-3: Detalle de los reactivos que se utilizaron

DETALLE DE LOS REACTIVOS	PESO	COMPOSICIÓN
Agar papa dextrosa agar (PDA)	1,5 g	100 ml H ₂ O
Agar – nutritivo (AN)	2,8 g	100 ml H ₂ O
Agar – avena (AA)	10 g	500 ml H ₂ O d
Cloranfenicol (1 cápsula de 200 mg)	0,10	
Ketoconazol (1 cápsula de 200 mg)	100 mg	

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

El Agar Papa Dextrosa (PDA)

Es utilizado para el cultivo de hongos, es un medio de propósito general para levaduras y mohos que puede ser suplementado con ácidos o antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano.

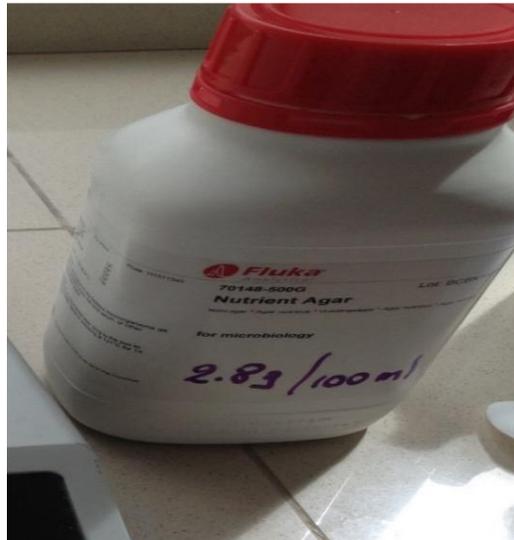


Fotografía 3-3: Agar Papa Dextrosa

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

Agar Nutritivo (AN)

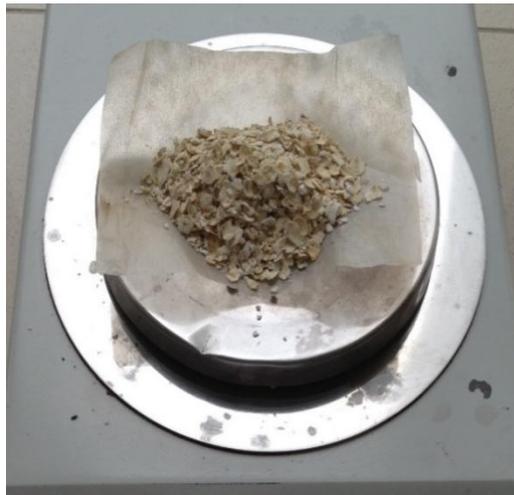
El agar nutritivo es un medio de cultivo usado normalmente como rutina para todo tipo de bacteria.



Fotografía 4-3: Agar – Nutritivo (AN)
Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

Agar Avena (AA)

Par la identificación de los actinos



Fotografía 5-3: Agar – Avena (AA)
Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

Cloranfenicol

El cloranfenicol es un fármaco térmicamente estable, efectivo frente a un amplio espectro de microorganismos.



Fotografía 6-3: Cloranfenicol

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

Ketoconazol

Este medicamento se utiliza para el tratamiento de las infecciones producidas por hongos y levaduras.



Fotografía 7-3: Ketoconazol

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

Equipos y Materiales

Equipos

- Autoclave
- Balanza
- Cámara de flujo laminar
- Estufa
- Incubadora
- Pipetas automática de 1ml y 100 μ l
- Shaker
- pH meter

Materiales

- 1 muestras compuestas de suelos contaminados con petróleo procedentes de un suelo para uso agrícola.
- 9 Cajas petri con PDA (1,5 g + cloranfenicol (1 cápsula de 500 mg) en 500 ml de H₂O destilada)
- 9 Cajas petri con agar nutritivo (2,8 g) + 100 mg ketoconazol
- 9 Cajas petri con agar avena (100 ml) con un pH de 4,78 + 100 mg ketoconazol
- Asa de transferencia
- Marcador permanente
- Masking
- Alcohol antiséptico
- Toallas Absorbentes
- Guantes de manejo

Procedimiento

Para el aislamiento de microorganismos del suelo se aplicará el **método de dilución**.

- a) Pesar 10 gr de avena y colocar en una olla y adicionar 500 ml de agua destilada.



Fotografía 8-3: Peso de la Avena 10 gr
Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- b) Seguidamente proceder a llevar a la estufa hasta conseguir que se disuelva la avena se obtendrá un resultado espeso en forma de colada.



Fotografía 9-3: Disolución de la avena
Elaborado: Loayza Fernanda, 2017

- c) Una vez obtenido este resultado cernir, enfriar y medir en la probeta 100 ml de la avena disuelta y proceder a tomar la lectura en el pH metro
- d) La lectura que se obtuvo es 4,78



Fotografía 10-3: Lectura del pH
Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- e) Pesar 1,5 gr de PDA y agregar los 100 ml del agar avena más 100 ml de agua destilada y 100 mg de ketoconazol.



Fotografía 11-3: Peso del Agar PDA
Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- f) Pesar el agra nutritivo 2,8 gr y adicionar 100 ml de agua destilada



Fotografía 12 -3: Peso del Agar Nutritivo
Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- g) Todas estas muestras preparadas se las llevara a un proceso de esterilización.



Fotografía 13-3: Proceso de Esterilización
Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- h) Pesar 10 gr del suelo contaminado de cada una de las muestras obtenidas



Fotografía 14 -3: Peso del Suelo contaminado
Elaborado por: Loayza Fernanda, 2016

- i) Colocarlas en un frasco y añadir 100 ml de agua destilada a cada muestra
j) Agitar durante 20 minutos cada una de las muestras.
k) Preparar las cajas petris a utilizarse con los diferentes medios de cultivo



Fotografía 15-3: Preparación de las Cajas petris

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- l) Distribuir los tres tipos de agares (PDA , AN y AA) en las cajas petris
- m) Con la ayuda de la pipeta Transferir 1 ml de la muestra 1 de suelo contaminado a blancos de dilución para obtener diluciones $1/10^2$, $1/10^3$ y $1/10^4$).
- n) Colocar 100 μl de la dilución $1/10^4$ en las tres cajas Petri a utilizarse para los diferentes medios de cultivo.
- o) Con ayuda de un dispersor o rastrillo estéril distribuya uniformemente el material en cada una de las cajas petri con los respectivos medios de cultivo.
- p) Incube las cajas a 28°C , hasta que aparezcan colonias visibles.



Fotografía 16-3: Incubación a 28°C

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

3.8.2. Evaluar la eficiencia degradativa de las tres especies de hongos sobre suelo contaminado con petróleo

3.8.2.1 Preparación o multiplicación de los Hongos

Reactivos

- Agar papa dextrosa agar (PDA)

Equipos

- Autoclave
- Cámara de flujo
- Estufa

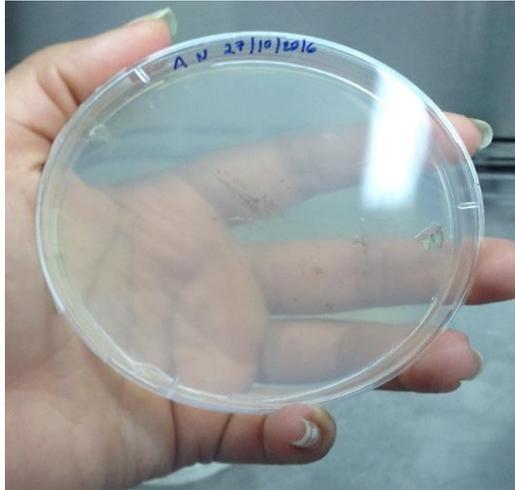
Materiales

- 3 especies de hongos
- 15 cajas petris
- Asa de transferencia
- Marcador permanente
- Alcohol antiséptico
- Toallas Absorbentes

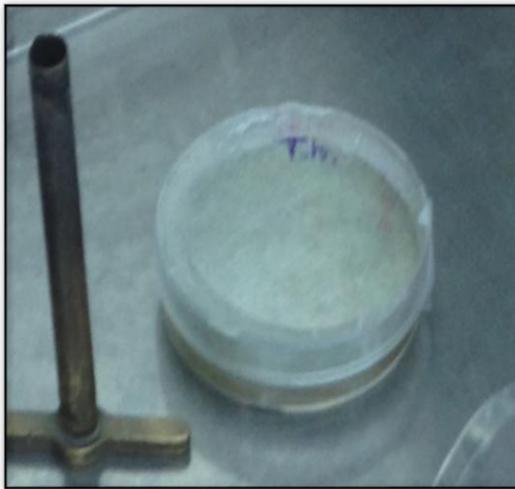
Procedimiento

a. Distribuimos 15 ml del medio agar PDA en cada una de las cajas petris a utilizarse de las tres especies de hongos.

b. Una vez colocado el medio de cultivo agar PDA procedemos a colocar las tres especies de hongos se utilizaran 5 cajas petris por cada especie de hongo (*Aspergillus Niger*, *Thichoderma Harzianum* y *Paecilomyces Lilacinus*)



Fotografía 17-3: *Aspergillus niger*
Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017



Fotografía 18-3: *Thichoderma harzianum*
Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017



Fotografía 19-3: *Paecilomyces Lilacinus*
Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

c. Una vez sembrado los hongos en las cajas petris con el medio de cultivo agar PDA se procederá a sellar las cajas con cinta masking y la respectiva rotulación a cada una de las muestras.



Fotografía 20-3: Sellado de las cajas

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

d.- Incube las cajas a 28 °C, hasta obtener resultados



Fotografía 21-3: Incubación

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

3.8.2.2 Siembra respectiva de las tres especies de hongos en el suelo contaminado con petróleo

Reactivos

- Agar papa dextrosa agar (PDA)

Equipos

- Autoclave
- Cámara de flujo
- Estufa

Materiales

- 3 especies de hongos
- 100 gr de suelo contaminado con petróleo
- 1000 ml de agua destilada
- 60 cajas petris
- 24 tubos para diluciones con 9 ml de aguas destilada
- Asa de transferencia
- Marcador permanente
- Alcohol antiséptico
- Toallas Absorbentes

Procedimiento:

Tabla 6-3: Descripción del procedimiento que se empleará tanto con Suelo Esterilizado y con Suelo no Esterilizado

Suelo Esterilizado	Suelo no Esterilizado
 <p>20 gr PDA</p> <p>500 ml de agua destilada</p> <p>50 gr de suelo esterilizado</p>	 <p>20 gr PDA</p> <p>500 ml de agua destilada</p> <p>50 gr suelo no esterilizado</p>

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- a. Utilizar dos frascos de 500 ml para la preparación de los medios de cultivos con suelo esterilizado y con suelo no esterilizado.
- b. Colocar 9 ml de agua destilada en los 24 tubos para las respectivas diluciones a utilizarse.



Fotografía 22-3: Tubos que contienen agua destilada

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- c. Seguidamente se procederá a llevar a esterilizar los 24 tubos para diluciones con el agua destilada las, puntas para pipetas automáticas, el asa de transferencia y los 2 frascos de 500 ml, cada frasco contiene:
 - ✓ En el primer frasco de 500 ml se colocará 20 gr de PDA (Agar de Patata Dextrosa), 500 ml de agua destilada y finalmente 50 gr de suelo que se llevara a un proceso de esterilización.
 - ✓ En el segundo frasco de 500 ml se colocará 20 gr de PDA (Agar de Patata y Dextrosa), 500 ml de agua destilada.



Fotografía 23-3: Materiales a esterilización

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- d. Una vez terminado el proceso de esterilización se procederá a llevar los materiales a la cámara de flujo para que se solidifiquen y proceder a realizar la respectiva siembra.



Fotografía 24-3: Cajas petris para la siembra en la cámara de flujo
Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

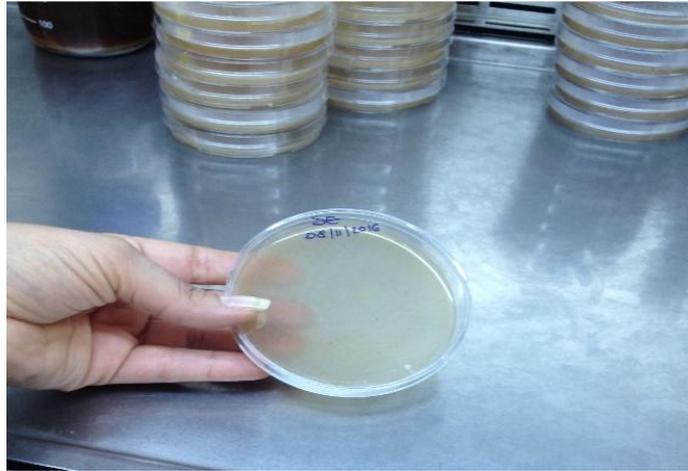
- e. En el segundo frasco de 500 ml se adicionara los 50 gr de suelo no esterilizado



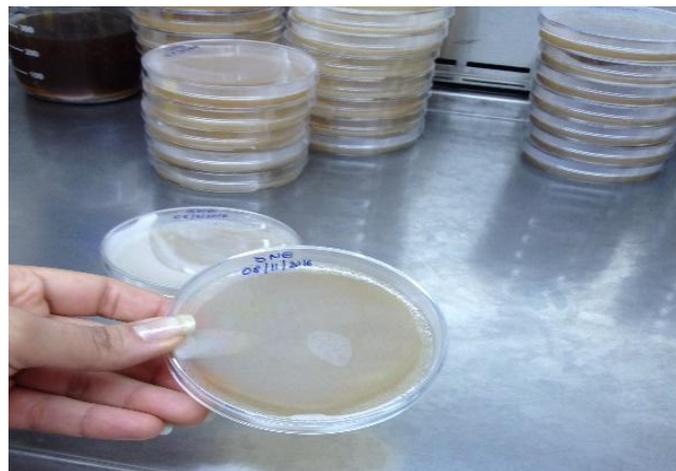
Fotografía 25-3: Colocación del Suelo no Esterilizado
Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- f. Se utilizaran un total de 54 cajas petris para la siembra respectiva con las tres especies de hongos y 6 cajas petris para los controles.
- g. Para la siembra procedemos a distribuir los 500 ml de **SUELO ESTERILIZADO** en las 27 cajas petris; de la misma manera lo realizamos con el **SUELO NO ESTERILIZADO** distribuimos los 500 ml en las 27 cajas petris.

- h. Una vez distribuido todo el medio de cultivo en las cajas petris tanto del **SUELO ESTERILIZADO** como del **SUELO NO ESTERILIZADO** procedemos a rotular y subdividir las cajas petris para las tres especies de hongos a utilizarse.



Fotografía 26-3: Cajas petris con Suelo Esterilizado
Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017



Fotografía 27-3: Cajas petris con Suelo No Esterilizado
Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017



**Fotografía 28-3: Especies de Hongos a utilizarse *Aspergillus niger*,
Paecilomyces lilacinus y *Thichoderma harzianum***

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- i. Primero preparamos las diluciones con la especie de hongo *Thichoderma Harzianum*



Fotografía 29 -3: Hongo *Thichoderma harzianum*

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- ✓ Utilizaremos un tubo de dilución el mismo que contiene 9 ml de agua destilada y lo colocamos en la caja Petri y remover con el rastrillo
- ✓ Seguidamente transferir con la pipeta de la caja Petri 1 ml y colocar en un tubo de dilución el mismo que será la dilución 10^{-2}
- ✓ Del tubo de dilución 10^{-2} transferir con la pipeta 1 ml en otro tubo de dilución el mismo que será la dilución 10^{-3}
- ✓ Del tubo de dilución 10^{-3} transferir con la pipeta 1 ml en otro tubo de dilución el mismo que será la dilución 10^{-4}
- ✓ El contenido restante de la caja Petri con la especie de hongo *Thichoderma Harzianum* lo colocaremos en un tubo de dilución que será la dilución 10^{-1}



Fotografía 30-3: *Thichoderma Harzianum* dilución 10^{-1}
Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- j. Procederemos a sembrar con la especie de hongo *Thichoderma harzianum* en el **SUELO ESTERILIZADO** y **SUELO NO ESTERILIZADO** utilizando 9 cajas petris para cada tipo de suelo, con 3 diluciones respectivas quedando representado de la siguiente manera:
- 9 cajas petris para la especie de hongo *Thichoderma harzianum* + **SUELO ESTERILIZADO**
 - dilución 10^{-2} y tres repeticiones
 - dilución 10^{-3} y tres repeticiones
 - dilución 10^{-4} y tres repeticiones

 - 9 cajas petris para la especie de hongo *Thichoderma harzianum* + **SUELO NO ESTERILIZADO**
 - dilución 10^{-2} y tres repeticiones
 - dilución 10^{-3} y tres repeticiones
 - dilución 10^{-4} y tres repeticiones
- k. Segundo preparamos las diluciones con la especie de hongo *Paecilomyces Lilacinus*



Fotografía 31-3: Hongo *Paecilomyces Lilacinus*

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- ✓ Utilizaremos un tubo de dilución el mismo que contiene 9 ml de agua destilada y lo colocamos en la caja Petri y remover con el rastrillo
- ✓ Seguidamente transferir con la pipeta de la caja Petri 1 ml y colocar en un tubo de dilución el mismo que será la dilución 10^{-2}
- ✓ Del tubo de dilución 10^{-2} transferir con la pipeta 1 ml en otro tubo de dilución el mismo que será la dilución 10^{-3}
- ✓ Del tubo de dilución 10^{-3} transferir con la pipeta 1 ml en otro tubo de dilución el mismo que será la dilución 10^{-4}
- ✓ El contenido restante de la caja Petri con la especie de hongo *Paecilomyces Lilacinus* lo colocaremos en un tubo de dilución que será la dilución 10^{-1}

1. Procederemos a sembrar con la especie de hongo *Paecilomyces Lilacinus* en el **SUELO ESTERILIZADO** y **SUELO NO ESTERILIZADO** utilizando 9 cajas petris para cada tipo de suelo, con 3 diluciones respectivas quedando representado de la siguiente manera:

- 9 cajas petris para la especie de hongo *Paecilomyces Lilacinus* + **SUELO ESTERILIZADO**
 - dilución 10^{-2} y tres repeticiones
 - dilución 10^{-3} y tres repeticiones
 - dilución 10^{-4} y tres repeticiones

➤ 9 cajas petris para la especie de hongo *Paecilomyces Lilacinus* + **SUELO NO ESTERILIZADO**

- dilución 10^{-2} y tres repeticiones
- dilución 10^{-3} y tres repeticiones
- dilución 10^{-4} y tres repeticiones

m. Tercero preparamos las diluciones con la especie de hongo *Aspergillus Niger*



Fotografía 32-3: Hongo *Aspergillus Niger*

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

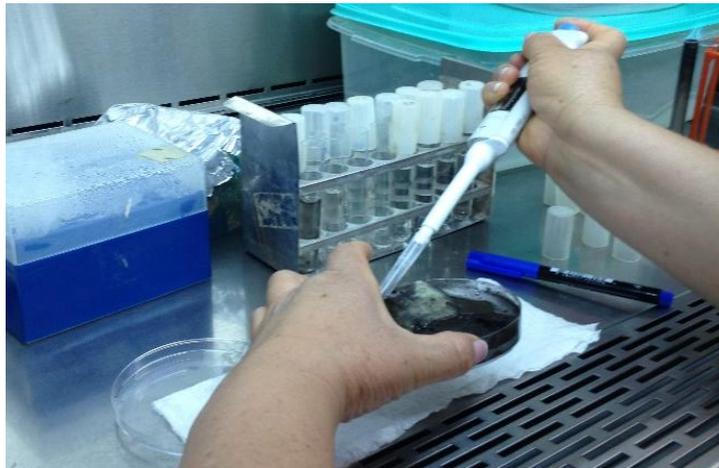
✓ Utilizaremos un tubo de dilución el mismo que contiene 9 ml de agua destilada y lo colocamos en la caja Petri y remover con el rastrillo



Fotografía 33-3: Tubos con 9 ml de Agua destilada

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- ✓ Seguidamente transferir con la pipeta de la caja Petri 1 ml y colocar en un tubo de dilución el mismo que será la dilución 10^{-2}
- ✓ Del tubo de dilución 10^{-2} transferir con la pipeta 1 ml en otro tubo de dilución el mismo que será la dilución 10^{-3}
- ✓ Del tubo de dilución 10^{-3} transferir con la pipeta 1 ml en otro tubo de dilución el mismo que será la dilución 10^{-4}
- ✓ El contenido restante de la caja Petri con la especie de hongo *Aspergillus Niger* lo colocaremos en un tubo de dilución que será la dilución 10^{-1}



Fotografía 34-3: *Aspergillus Niger* dilución 10^{-1}
 Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

n. Procederemos a sembrar con la especie de hongo *Aspergillus Niger* en el **SUELO ESTERILIZADO** y **SUELO NO ESTERILIZADO** utilizando 9 cajas petris para cada tipo de suelo, con 3 diluciones respectivas quedando representado de la siguiente manera: :

➤ 9 cajas petris para la especie de hongo *Aspergillus Niger* + **SUELO ESTERILIZADO**

- dilución 10^{-2} y tres repeticiones
- dilución 10^{-3} y tres repeticiones
- dilución 10^{-4} y tres repeticiones

➤ 9 cajas petris para la especie de hongo *Aspergillus Niger* + **SUELO NO ESTERILIZADO**

- dilución 10^{-2} y tres repeticiones

- dilución 10^{-3} y tres repeticiones
 - dilución 10^{-4} y tres repeticiones
- o. Se utilizaran 6 cajas petris para los controles respectivos tanto para suelos esterilizados y no esterilizados:
- 2 cajas petris para la especie de hongo *Aspergillus Niger* divididas en:
 - 1 cajas petris con dilución 10^{-2} primera repetición
 - 1 cajas petris con dilución 10^{-3} segunda repetición
 - 2 cajas petris para la especie de hongo *Thichoderma Harzianum*
 - 1 cajas petris con dilución 10^{-2} primera repetición
 - 1 cajas petris con dilución 10^{-3} segunda repetición
 - 2 cajas petris para la especie de hongo *Paecilomyces Lilacinus*
 - 1 cajas petris con dilución 10^{-2} primera repetición
 - 1 cajas petris con dilución 10^{-3} segunda repetición
- p. Con ayuda de un dispersor o rastrillo estéril distribuya uniformemente el material en cada una de las cajas petri con los respectivos medios de cultivo.
- q. Incube las cajas a 28°C, hasta que aparezcan colonias visibles.

3.8.3. *Evaluar la presencia de los agentes biológicos utilizados después de los tratamientos.*

3.8.3.1 *Evaluación de la presencia de las tres especies de hongos sobre el suelo contaminado con petróleo*

Equipos:

- Autoclave
- Cámara de flujo
- Estufa

Materiales:

- 3 especies de hongos
- 30 gr de suelo
- 30 cajas petris
- Asa de transferencia
- Marcador permanente
- Alcohol antiséptico
- Toallas Absorbentes

Procedimiento

- a) Pesar 10 gr de suelo contaminado con petróleo y colocar en cada caja petri a utilizarse.

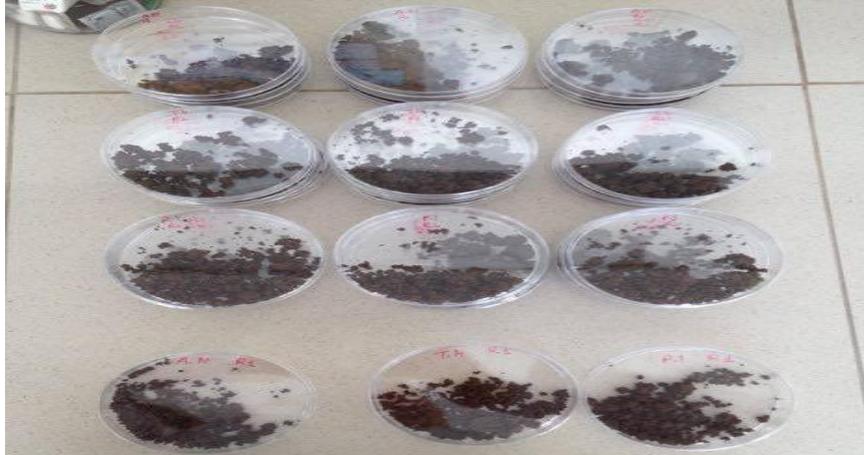


Fotografía 35 -3: Peso del suelo contaminado

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- b) Distribuir las cajas petris para realizar la respectiva siembra con las tres especies de hongos benéficos a utilizarse (*Aspergillus niger*, *Thichoderma harzianum* y *Paecilomyces lilacinus*)
- c) Colocar 9 ml de agua destilada en los 24 tubos para las respectivas diluciones a utilizarse
- d) Seguidamente se procederá a llevar a esterilizar los 24 tubos para diluciones con el agua destilada las, puntas para las pipetas automáticas, y el asa de transferencia.
- e) Una vez terminado el proceso de esterilización se procederá a llevar los materiales a la cámara de flujo para que se solidifiquen y proceder a realizar la respectiva siembra.

- f) Se utilizarán un total de 27 cajas petris para la siembra respectiva con las tres especies de hongos y 3 cajas petris para los controles



Fotografía 36-3: Suelo contaminado más las tres especies de Hongos

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- g) Primero preparamos las diluciones con la especie de hongo *Thichoderma Harzianum*
- ✓ Utilizaremos un tubo de dilución el mismo que contiene 9 ml de agua destilada y lo colocamos en la caja Petri y remover con el rastrillo
 - ✓ Seguidamente transferir con la pipeta de la caja Petri 1 ml y colocar en un tubo de dilución el mismo que será la dilución 10^{-2}
 - ✓ Del tubo de dilución 10^{-2} transferir con la pipeta 1 ml en otro tubo de dilución el mismo que será la dilución 10^{-3}
 - ✓ Del tubo de dilución 10^{-3} transferir con la pipeta 1 ml en otro tubo de dilución el mismo que será la dilución 10^{-4}
 - ✓ El contenido restante de la caja Petri con la especie de hongo *Thichoderma Harzianum* lo colocaremos en un tubo de dilución que será la dilución 10^{-1}
- h) Procederemos a sembrar con la especie de hongo *Thichoderma Harzianum* en el **SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO** utilizando 9 cajas petris con las 3 diluciones respectivas quedando representado de la siguiente manera:
- ✓ 9 cajas petris para la especie de hongo *Thichoderma Harzianum* + **SUELO CONTAMINADO**

- dilución 10^{-2} y tres repeticiones
- dilución 10^{-3} y tres repeticiones
- dilución 10^{-4} y tres repeticiones

i) Segundo preparamos las diluciones con la especie de hongo *Paecilomyces Lilacinus*

- ✓ Utilizaremos un tubo de dilución el mismo que contiene 9 ml de agua destilada y lo colocamos en la caja Petri y remover con el rastrillo
- ✓ Seguidamente transferir con la pipeta de la caja Petri 1 ml y colocar en un tubo de dilución el mismo que será la dilución 10^{-2}
- ✓ Del tubo de dilución 10^{-2} transferir con la pipeta 1 ml en otro tubo de dilución el mismo que será la dilución 10^{-3}
- ✓ Del tubo de dilución 10^{-3} transferir con la pipeta 1 ml en otro tubo de dilución el mismo que será la dilución 10^{-4}
- ✓ El contenido restante de la caja Petri con la especie de hongo *Paecilomyces Lilacinus* lo colocaremos en un tubo de dilución que será la dilución 10^{-1}

j) Procederemos a sembrar con la especie de hongo *Paecilomyces Lilacinus* en el **SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO** utilizando 9 cajas petris con las 3 diluciones respectivas quedando representado de la siguiente manera:

- ✓ 9 cajas petris para la especie de hongo *Paecilomyces Lilacinus* + **SUELO ESTERILIZADO**
 - dilución 10^{-2} y tres repeticiones
 - dilución 10^{-3} y tres repeticiones
 - dilución 10^{-4} y tres repeticiones

k) Tercero preparamos las diluciones con la especie de hongo *Aspergillus Niger*

- ✓ Utilizaremos un tubo de dilución el mismo que contiene 9 ml de agua destilada y lo colocamos en la caja Petri y remover con el rastrillo
- ✓ Seguidamente transferir con la pipeta de la caja Petri 1 ml y colocar en un tubo de dilución el mismo que será la dilución 10^{-2}

- ✓ Del tubo de dilución 10^{-2} transferir con la pipeta 1 ml en otro tubo de dilución el mismo que será la dilución 10^{-3}
- ✓ Del tubo de dilución 10^{-3} transferir con la pipeta 1 ml en otro tubo de dilución el mismo que será la dilución 10^{-4}
- ✓ El contenido restante de la caja Petri con la especie de hongo *Aspergillus Níger* lo colocaremos en un tubo de dilución que será la dilución 10^{-1}

I) Procederemos a sembrar con la especie de hongo *Aspergillus Níger* en el **SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO** utilizando 9 cajas petris con las 3 diluciones respectivas quedando representado de la siguiente manera:

- ✓ 9 cajas petris para la especie de hongo *Aspergillus Níger* + **SUELO ESTERILIZADO**
 - dilución 10^{-2} y tres repeticiones
 - dilución 10^{-3} y tres repeticiones
 - dilución 10^{-4} y tres repeticiones

m) Se utilizaran 3 cajas petris para los controles respectivos de las tres especies de hongos benéficos divididas en:

Especie de hongo *Thichoderma Harzianum*

- ✓ Transferir con la pipeta 1 ml de agua destilada en la caja petris con los 10 gr de suelo contaminado.

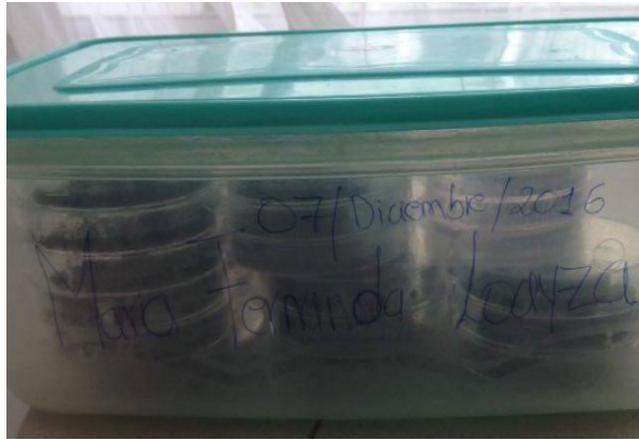
Especie de hongo *Paecilomyces Lilacinus*

- ✓ Transferir con la pipeta 1 ml de agua destilada en la caja petris con los 10 gr de suelo contaminado.

Especie de hongo *Aspergillus Niger*

- ✓ Transferir con la pipeta 1 ml de agua destilada en la caja petris con los 10 gr de suelo contaminado.

- n) Ubicarlas en un recipiente de plástico grande con tapa a las 30 cajas petris y colocar alrededor del recipiente vaselina para evitar el ingreso de ácaros.



Fotografía 37-3: 30 Cajas petris para los análisis

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- o) Todas las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 30 días para obtener los resultados.

3.8.3.2 Identificación y conteo de los microorganismos en el suelo contaminado con petróleo después de los tratamientos

Equipos:

- Autoclave
- Balanza
- Estufa
- Incubadora
- Shaker
- pH meter

Materiales:

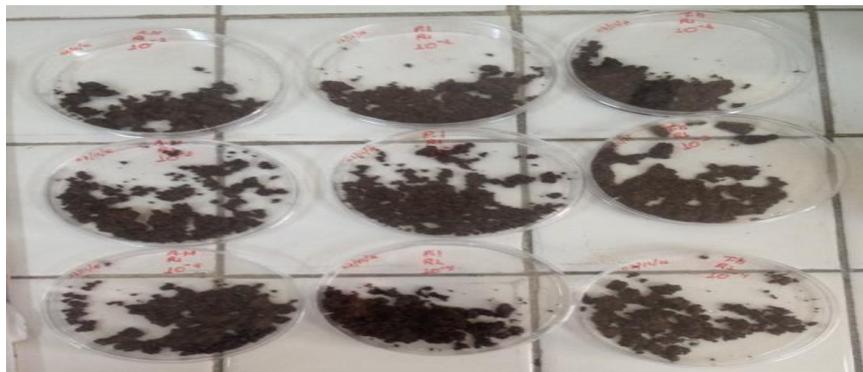
- 9 muestras de 10 gr de suelo contaminados con petróleo
- 9 Cajas Petri con medio de cultivo PDA
- 9 Cajas Petri con agar nutritivo

- 9 Cajas Petri con agar avena
- Asa de transferencia
- Marcador permanente
- Masking
- Alcohol antiséptico
- Toallas Absorbentes
- Guantes de manejo

Procedimiento

Para el aislamiento de microorganismos del suelo después de los tratamientos se aplicará el método de dilución.

- Pesar 10 gr de avena y colocar en una olla y adicionar 500 ml de agua destilada.
- Seguidamente proceder a llevar a la estufa hasta conseguir que se disuelva la avena se obtendrá un resultado espeso en forma de colada.
- Una vez obtenido este resultado cernir, enfriar y proceder a tomar la lectura en el pH metro
- La lectura que se obtuvo es 5,00
- Pesar 7,5 gr de agar neutro y adicionarle en el agar avena
- Pesar 20 gr de PDA y agregar 500 ml de agua destilada
- Pesar 20 gr de agar nutritivo adicionar 500 ml de agua destilada
- Todas estas muestras preparadas se las llevara a un proceso de esterilización.
- Colocarlas en cada frasco correspondiente a las 9 muestras de 10 gr de suelo contaminado y añadirle 80 ml de agua destilada a cada frasco



Fotografía 38 -3: Utilización de 9 Muestras de suelo contaminado
Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- Agitar durante 20 minutos cada una de las muestras.

k) Preparar las cajas Petris a utilizarse con los diferentes medios de cultivo



Fotografía 39-3: Medios de cultivo
Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

l) Distribuir los tres tipos de agares (PDA , AN y AA) en las cajas petris



Fotografía 40 -3: Distribución de los diferentes medios de cultivo
Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

m) Con la ayuda de la pipeta Transferir 1 ml de cada una de las 9 muestras de suelo contaminado a blancos de dilución para obtener diluciones $1/10^2$, $1/10^3$ y $1/10^4$)



Fotografía 41-3: Muestras de suelo con la especie de Hongo *Aspergillus Niger*

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017



Fotografía 42-3: Muestras de suelo con la especie de Hongo *Thichoderma Harzianum*

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017



Fotografía 43-3: Muestras de suelo con la especie de Hongo *Paecilomyces Lilacinus*

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

- n)** Colocar 100 μl de la dilución $1/10^4$ en las tres cajas Petri a utilizarse por cada muestra para los diferentes medios de cultivo
- o)** Con ayuda de un dispersor o rastrillo estéril distribuya uniformemente el material en cada una de las cajas Petris con los respectivos medios de cultivo.
- p)** Incube las cajas a 28°C , hasta que aparezcan colonias visibles.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis de resultados

4.1.1. Evaluación de las características físicas, químicas y biológicas de los suelos antes de los tratamientos.

- **Características Físicas**

Tabla 1-4: Resultados de los Parámetros Físicos

Ident.	Textura	Estructura	Estab. Estructural	%		Consistencia		
				Poros	Cond. Elect.	Seco	Húmedo	Mojado
Muestra de Suelo	Franco arenosa	Suelta	Baja	44.2	29.5	Suelto	Suelto	No plástico / no adherente

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

Dentro de los parámetros Físicos analizados del suelo contaminado con petróleo los resultados que presentaron fueron una textura franco arenosa, estructura suelta con una porosidad de 44,2%, una conductividad eléctrica de 29,5.

Estos análisis fueron realizados en el Laboratorio de Suelos de la Facultad de Recursos Naturales.

- **Características Químicas**

Tabla 2-4: Resultados de los Parámetros Químicos

Ident.	pH	%M.O	mg/L		Meq/100g			Ppm		
			NH4	P	K	Ca	Mg	Zn	Mn	Fe
Muestra de Suelo	5.3 Lac.	4.0 M	8.5 B	11.1 B	0.64 A	4.1 B	2.8 M	2.2 B	10.1 B	267.6 A

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

Dentro de los parámetros Químicos analizados del suelo contaminado con petróleo los resultados que presentaron fueron un pH de 5.3, el % de materia orgánica 4 que está en un nivel medio, el Fosforo 11.1 a un nivel bajo, el Potasio 0.64 a un nivel alto, el Calcio 4.1 a un nivel bajo, el Magnesio 2.8 a un nivel medio, el Zinc 2.2 a un nivel bajo, el Manganeseo 10.1 a un nivel bajo y el Hierro 267.6 a un nivel alto.

Estos análisis fueron realizados en el Laboratorio de Suelos de la Facultad de Recursos Naturales.

- **Características Biológicas**

Los resultados alcanzados dentro de las características Biológicas en el suelo contaminado con petróleo antes de los tratamientos se obtendrán el conteo de los microorganismos para hongos, bacterias y actinos los mismos que se analizaron con un tipo de muestras compuesta, y tres medios de cultivos (PDA, AA, AN)

Tabla 3-4: Resultados del conteo de los microorganismos antes de los tratamientos

AGAR PDA (HONGOS)	AGAR NUTRITIVO (BACTERIAS)	AGAR AVENA (ACTINOS)
6×10^6 UFC/g	5.12×10^6 UFC/g	7.1×10^5 UFC/g

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

4.1.2 Evaluación de la eficiencia degradativa de las tres especies de hongos sobre suelo contaminado con petróleo.

4.1.2.1 Resultados de los análisis del Crecimiento con Suelo Esterilizado

Tabla 4-4: Resultados del Crecimiento con la especie de Hongo *Aspergillus Niger* en Suelo Esterilizado expresado en diámetro de las colonias (cm)

CODIFICACIÓN	ANPDAC1	ANPDAC2	ANPDAC3
R1	7,66	7,5	7,33
R2	7,83	8,25	7,83
R3	8,16	8,416	8,16

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

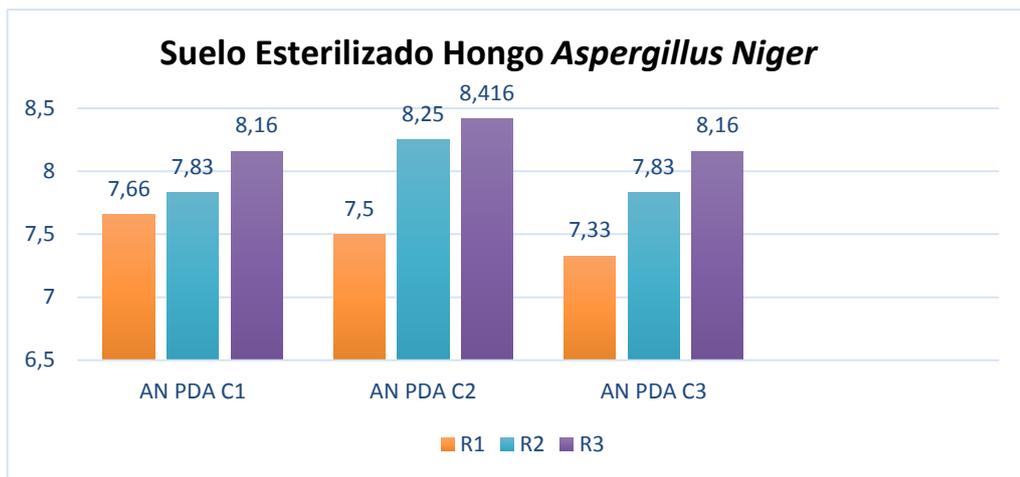


Gráfico 1-4: Crecimiento con el Suelo Esterilizado con el hongo *Aspergillus Niger*
 Elaborado por: Loayza Fernanda 2017

De acuerdo a los resultados obtenidos el mayor desarrollo de crecimiento con la especie de hongo *Aspergillus Niger* se presentó con la concentración 2 (C2) expresados en diámetro de las colonias (cm), realizados en cajas petris.

Tabla 5-4: Resultados del Crecimiento con la especie de Hongo *Thichoderma Harzianum* en Suelo Esterilizado expresado en diámetro de las colonias (cm)

CODIFICACIÓN	THPDAC1	THPDAC2	THPDAC3
R1	6	6	5,16
R2	7,66	7,41	7,25
R3	8,16	8	7,83

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

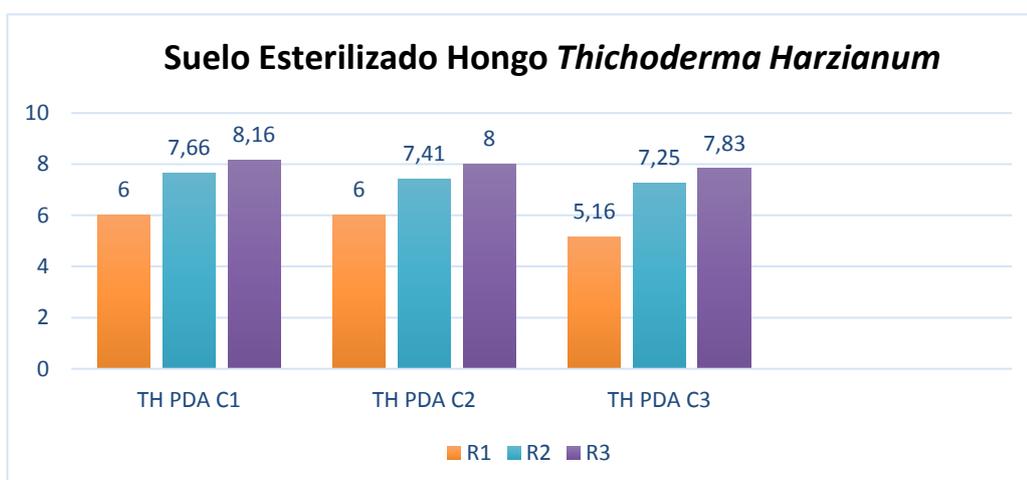


Gráfico 2-4: Crecimiento con el suelo Esterilizado con el hongo *Thichoderma Harzianum*

Elaborado por: Loayza Fernanda 2017

De acuerdo a los resultados obtenidos el mayor desarrollo de crecimiento con la especie de hongo *Thichoderma Harzianum* se presentó con la concentración 1 (C1) expresados en diámetro de las colonias (cm), realizados en cajas petris.

Tabla 6-4: Resultados del Crecimiento con la especie de Hongo *Paecilomyces Lilacinus* en Suelo Esterilizado expresado en diámetro de las colonias (cm)

CODIFICACIÓN	PLPDAC1	PLPDAC2	PLPDAC3
R1	4,58	4,83	5
R2	6,16	7	6,66
R3	6,83	7,33	7,33

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

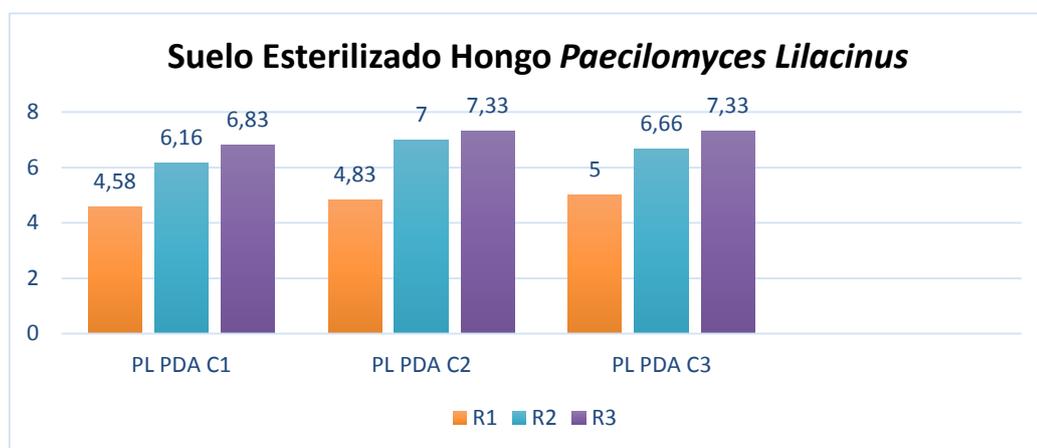


Gráfico 3-4: Crecimiento con el suelo Esterilizado con el hongo *Paecilomyces Lilacinus*

Elaborado por: Loayza Fernanda 2017

De acuerdo a los resultados obtenidos el mayor desarrollo de crecimiento con la especie de hongo *Paecilomyces Lilacinus* se presentó con la concentración 2 (C2) expresados en diámetro de las colonias (cm), realizados en cajas petris.

4.1.2.2 Resultados de los análisis del Crecimiento con Suelo no Esterilizado

Tabla 7-4: Resultados del Crecimiento con la especie de Hongo *Aspergillus Niger* en Suelo no Esterilizado expresado en diámetro de las colonias (cm)

CODIFICACIÓN	ANPDAC1	ANPDAC2	ANPDAC3
R1	2,16	1,16	1,16
R2	3,16	2	1,33
R3	3,5	2,33	2

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

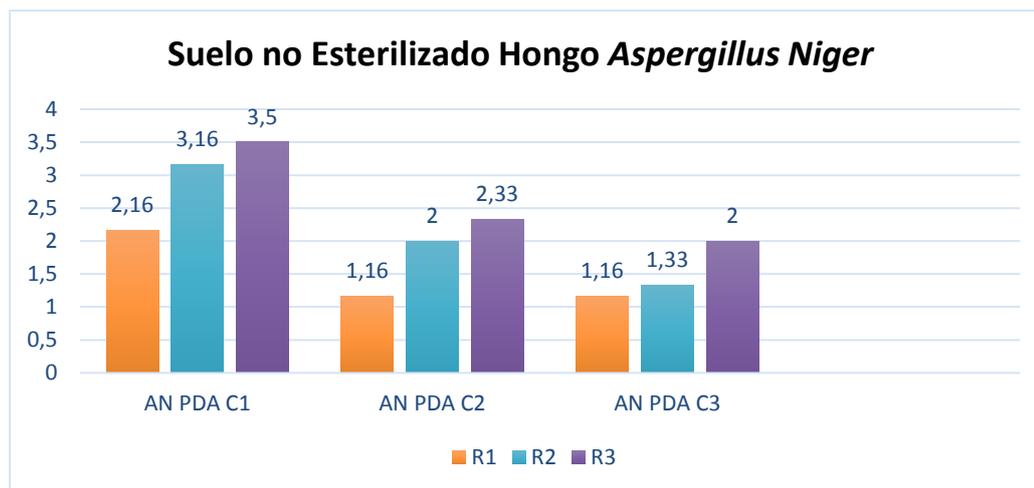


Gráfico 4-4: Crecimiento con el suelo no Esterilizado con el hongo *Aspergillus Niger*
 Elaborado por: Loayza Fernanda 2017

De acuerdo a los resultados obtenidos el mayor desarrollo de crecimiento con la especie de hongo *Aspergillus Niger* se presentó con la concentración 1 (C1) expresados en diámetro de las colonias (cm), realizados en cajas petris.

Tabla 8-4: Resultados del Crecimiento con la especie de Hongo *Thichoderma Harzianum* en Suelo no Esterilizado expresado en diámetro de las colonias (cm)

CODIFICACIÓN	THPDAC1	THPDAC2	THPDAC3
R1	3,33	3,83	3,83
R2	4	4,5	4,5
R3	4,83	5,16	5,66

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

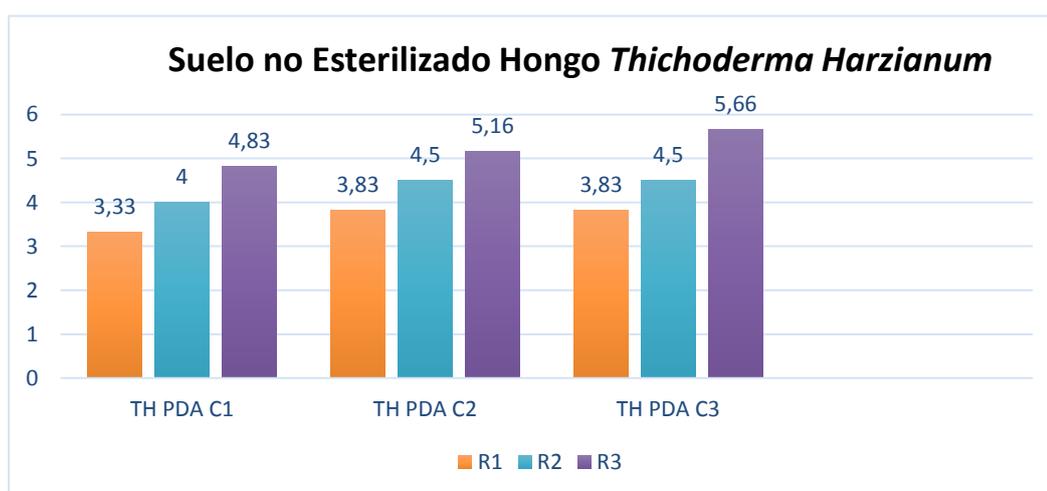


Gráfico 5-4: Crecimiento del suelo no Esterilizado con el hongo *Thichoderma Harzianum*

Elaborado por: Loayza Fernanda 2017

De acuerdo a los resultados obtenidos el mayor desarrollo de crecimiento con la especie de hongo *Asperlligus Niger* se presentó con la concentración 3 (C3) expresados en diámetro de las colonias (cm), realizados en cajas petris.

Tabla 9-4: Resultados del Crecimiento con la especie de Hongo Paecilomyces Lilacinus en Suelo no Esterilizado expresado en diámetro de las colonias (cm)

CODIFICACIÓN	ANPDAC1	ANPDAC2	ANPDAC3
R1	0	0	0
R2	0	0	0
R3	0	0	0

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

De acuerdo a los resultados obtenidos con el Suelo no Esterilizado de la especie de Hongo *Paecilomyces Lilacinus*, se presentó que con esta especie de hongo no se desarrolló su crecimiento con ningún tipo concentración.

Tabla 10-4: Resultados de los Controles durante el Crecimiento con las tres Especies de hongos expresado en diámetro de las colonias (cm)

CONTROLES					
CODIFICACIÓN	ANPDAC1	ANPDAC2	ANPDAC2	TOTAL	MEDIA
R1	6	7,5	7	20,5	6,83
R2	7	6	6	19	6,33
R3	7	7	6	20	6,66
CODIFICACIÓN	THPDAC1	THPDAC2	THPDAC2	TOTAL	MEDIA
R1	6	6,5	5	17,5	5,83
R2	5	7	5	17	5,66
R3	5	6	5,5	16,5	5,5
CODIFICACIÓN	PLPDAC1	PLPDAC2	PLPDAC3	TOTAL	MEDIA
R1	4,5	5	5	14,5	4,83
R2	5,5	4	6	15,5	5,16
R3	4	6	6	16	5,33

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

4.1.2.3 Conteo y Cálculos de esporas

Tabla 11-4: Resultados conteo de esporas

ESPECIE DE HONGO	DILUCIÓN	L # 1	L # 2	L # 3	L # 4	L # 5	TOTAL	MEDIA
<i>Aspergillus Niger</i> (AN)	10 ⁻²	12	17	14	9	15	67 cel/ml	14 cel/ml
<i>Thichodema Harzianum</i> (TH)	10 ⁻³	17	13	15	21	23	89 cel/ml	17 cel/ml
<i>Paecilomyces Lilacinus</i> (PL)	10 ⁻²	12	15	12	15	18	72 cel/ml	15 cel/ml

Elaborado por: Loayza Fernanda 2017

Cálculo de Esporas Especie de Hongo *Aspergillus Niger*

$$\text{FORMULA} = N * 10^{-4} * f$$

$$X = 14 * 10^{-4} * 10^{-2}$$

$$X = 1,4 * 10^{-5} \text{ cel/ml}$$

Cálculo de Esporas Especie de Hongo *Thichoderma Harzianum*

$$\text{FORMULA} = N * 10^{-4} * f$$

$$X = 17 * 10^{-4} * 10^{-2}$$

$$X = 1,7 * 10^{-5} \text{ cel/ml}$$

Cálculo de Esporas Especie de Hongo *Paecilomyces Lilacinus*

$$\text{FORMULA} = N * 10^{-4} * f$$

$$X = 15 * 10^{-4} * 10^{-2}$$

$$X = 1,5 * 10^{-5} \text{ cel/ml}$$

4.1.2.4 Análisis de la eficiencia degradativa de las tres especies de hongos sobre suelo contaminado con petróleo.

Resultados obtenidos de los análisis del parámetro TPHs para determinar el grado de eficiencia que presenta cada especie de hongo benéfico sobre el suelo contaminado con petróleo.

Tabla 12-4: Resultados de los TPHs con las tres Especies de Hongos

Identificación	Parámetro	Método	Referencia	Resultado	Unidad
AN 10 ²	TPHs	ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B,418.1	796,2	mg/Kg
AN 10 ³	TPHs	ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B,418.1	884,2	mg/Kg
AN 10 ⁴	TPHs	ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B,418.1	909	mg/Kg
TH 10 ²	TPHs	ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B,418.1	525,6	mg/Kg
TH 10 ³	TPHs	ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B,418.1	639,6	mg/Kg
TH 10 ⁴	TPHs	ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B,418.1	771,4	mg/Kg
PL 10 ²	TPHs	ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B,418.1	179,5	mg/Kg
PL 10 ³	TPHs	ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B,418.1	284,8	mg/Kg
PL 10 ⁴	TPHs	ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B,418.1	387,7	mg/Kg

Elaborado por: Loayza Fernanda 2017

4.1.3 Evaluar la presencia de los agentes biológicos utilizados después de los tratamientos

Los resultados de la evaluación de la presencia de los agentes biológicos utilizados después de los tratamientos en el suelo contaminado con petróleo se obtendrán mediante el conteo de los microorganismos, los mismos que se analizaron con tres especies de hongos (*Aspergillus Niger*, *Thichoderma Harzianum*, *Paecilomyces Lilacinus*) y tres medios de cultivos (PDA, AA, AN)

Tabla 13-4: Resultados del conteo de los microorganismos después de los tratamientos

AGAR PDA (HONGOS)	AGAR NUTRITIVO (BACTERIAS)	AGAR AVENA (ACTINOS)
1x10 ⁶ UFC/g	6x10 ⁵ UFC/g	4.3x10 ⁵ UFC/g

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

4.2.- Resultados de los análisis estadísticos

De acuerdo al análisis de varianza para el crecimiento de las colonias en cm de 3 especies de hongos benéficos en suelo contaminado con petróleo, se observa una diferencia altamente significativa para Hongos, Medio de Cultivo y para la interacción Hongos por Medio de Cultivo. El coeficiente de variación de la tabla 14.4 es C: V: 19,48 el mismo que indica que es normal.

Tabla 14-4: Análisis de varianza para el crecimiento de las colonias en cm de 3 especies de hongos benéficos en suelo contaminado con petróleo.

F.V	SC	gl	CM	F	p-Valor
HONGOS	58,06	2	29,03	51,23	<0,0001 **
MEDIO DE CULTIVO	247,90	1	247,90	437,43	<0,0001 **
CONCENTRACIÓN	0,40	2	0,20	0,35	0,7075 ns
HONGOS * MEDIO DE CULTIVO	36,74	2	18,37	32,41	<0,0001 **
HONGOS * CONCENTRACIÓN	1,81	4	0,45	0,80	0,5353 ns
MEDIO DE CULTIVO * CONCENTRACIÓN	0,18	2	0,09	0,16	0,8502 ns
HONGOS * MEDIO DE CULTIVO * CONCENTRACIÓN	1,92	4	0,48	0,85	0,5057 ns
ERROR	20,40	36	0,57		
TOTAL	347,40	53			

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

A continuación se muestra la tabla 15-4 de acuerdo a la prueba Tukey se realizó una comparación de medias para conocer el crecimiento de las colonias en cm de tres especies de hongos tanto con el uso del suelo esterilizado y suelo no esterilizado.

Tabla 15-4: Prueba de Tukey para crecimiento de las colonias en cm de 3 especies de hongos benéficos en suelo contaminado con petróleo.

HONGOS	MEDIAS	RANGO
<i>A. Niger</i> Suelo Esterilizado	7,49	A
<i>T. Harzianum</i> Suelo Esterilizado	5,72	B
<i>P. Lilacinus</i> Suelo Esterilizado	4,81	B
<i>T. Harzianum</i> Suelo no Esterilizado	3,67	C
<i>A. Niger</i> Suelo no Esterilizado	1,50	D
<i>P. Lilacinus</i> Suelo no Esterilizado	0,00	E

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

Los resultados de la prueba de Tukey con el uso del Suelo Esterilizado a los 5 días con la especie de hongo *A. Niger* se observó que tuvo un crecimiento de 7,49 correspondiente al rango A, con *T. Harzianum* un crecimiento de 5,72 y con *P. Lilacinus* un crecimiento de 4,81 correspondientes al rango B.

Con el uso del Suelo no Esterilizado a los 5 días con la especie de hongo *A. Niger* se observó que tuvo un crecimiento de 3,67 correspondiente al rango C, con *T. Harzianum* un crecimiento de 1,50 correspondiente al rango D y con *P. Lilacinus* no presento crecimiento.

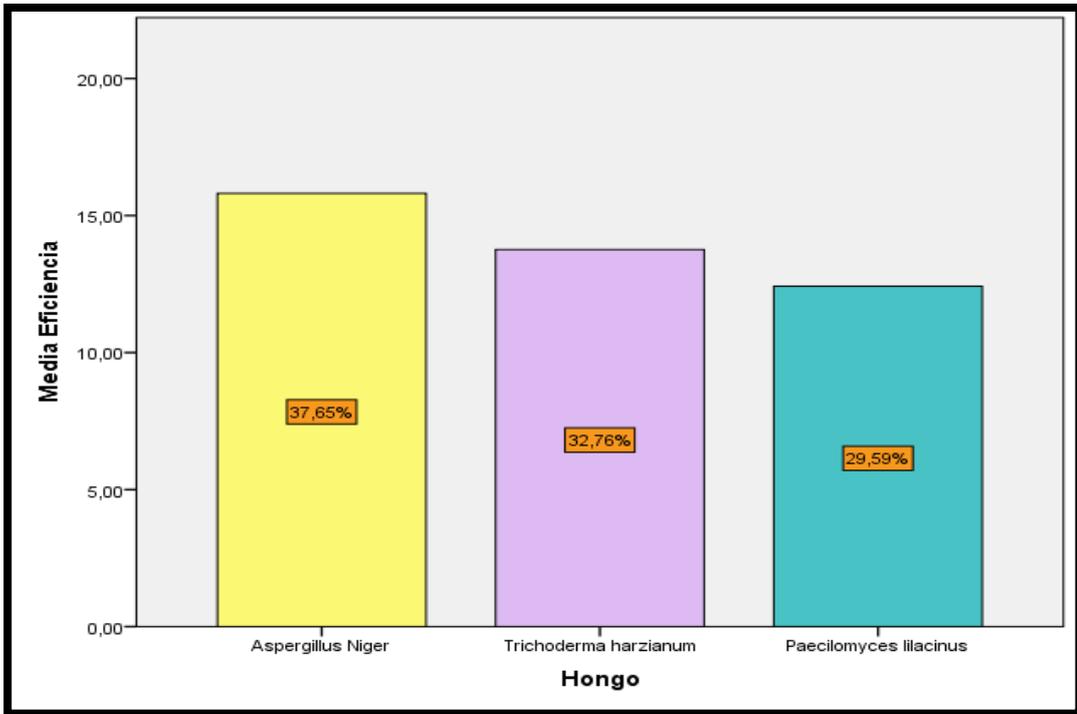


Gráfico 6-4: Resultados de la comparación de la eficiencia

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

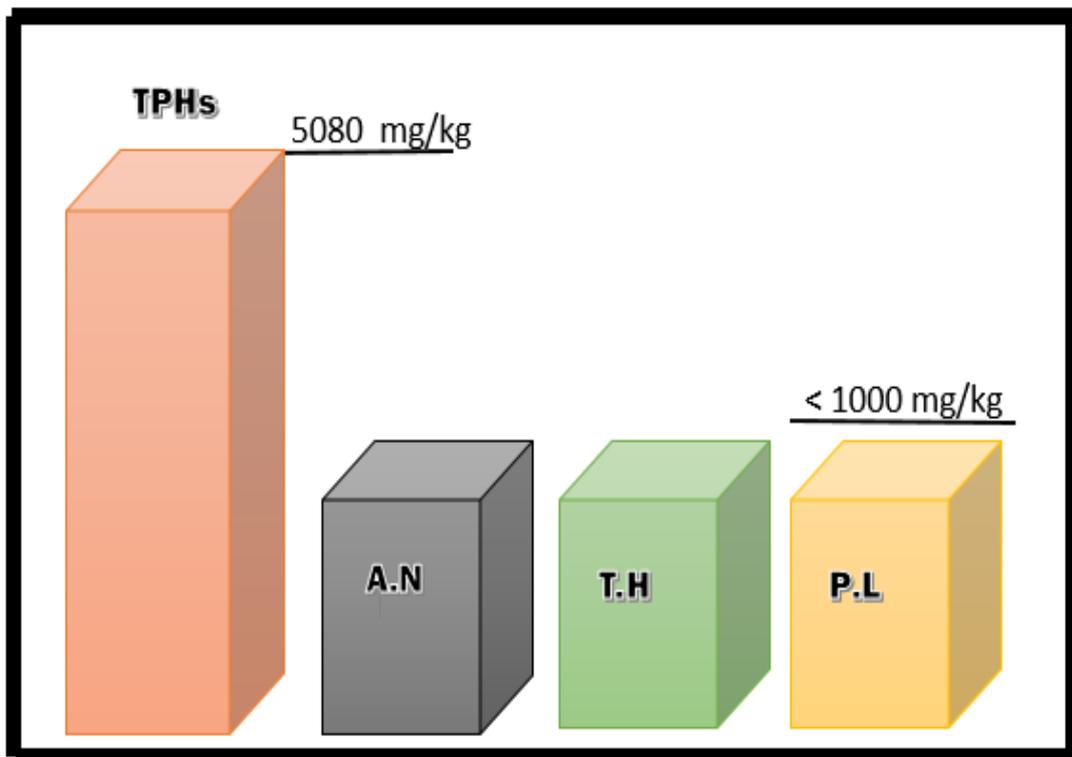


Gráfico 7-4: Niveles de Disminución de TPHs con la aplicación de las tres especies de hongos

Elaborado por: Loayza Fernanda, 2017

4.3.- Discusión de resultados

Dentro de las características físicas y químicas antes de los tratamientos mostraron resultados muy relevantes para el desarrollo de esta investigación.

En el conteo de microorganismos antes y después de los tratamientos se determinó que los microorganismos que presentaron mayor desarrollo fueron antes de los tratamientos, mientras que después de los tratamientos se evidenció que el número de microorganismos se redujo.

Mediante el uso del Suelo Esterilizado en la evaluación del crecimiento de las colonias en cm con la especie de hongo *Aspergillus niger* se observó un crecimiento de 7,49 correspondiente al rango A, con la especie de hongo *Thichoderma Harzianum* un crecimiento de 5,72 con la especie de hongo *Paecilomyces lilacinus* un crecimiento de 4,81 correspondientes al rango B. Con el uso del Suelo no Esterilizado en la evaluación del crecimiento de las colonias en cm con la especie de hongo *Aspergillus niger* se observó que tuvo un crecimiento de 3,67 correspondiente al rango C con la especie de hongo *Thichoderma harzianum* un crecimiento de 1,50 correspondiente al rango D y con *P. Lilacinus* no presentó crecimiento.

El proceso desarrollado al aplicar las tres especies de hongos benéficos muestran un 100% de eficiencia en la degradación de los hidrocarburos al reducir su concentración inicial de 5080 ppm a < 1000 ppm, por lo cual las tres especies de hongos son altamente efectivas en la degradación de hidrocarburos, presentando los resultados en porcentajes de la especie de hongo *Aspergillus niger* un 37,65%, de la especie de hongo *Thichoderma Harzianum* un 32,76 % y de la especie de hongo *Paecilomyces lilacinus* con un 29,59 %.

Después de obtener los resultados finales de los TPHs para la comparación de la eficiencia por medio de la aplicación de las tres especies de hongos benéficos (*Aspergillus niger*, *Thichoderma Harzianum*, y *Paecilomyces lilacinus*) sobre el suelo contaminado con petróleo, presentando los resultados en porcentajes, tomando desde el punto de vista numérico es más eficiente la especie de hongo *Aspergillus niger* con el 37,65%. La utilización de estas tres especies de hongos benéficos se adaptaron al suelo contaminado, estas especies de hongos presentaron resultados altamente efectivos en la degradación de hidrocarburos.

CONCLUSIONES

- ❖ La concentración de TPHs presente según la tabla 6 del RAOHE no debe superar los 2500 mg/kg de acuerdo al uso agrícola, razón por la cual la investigación que se llevó a cabo obtuvo un valor inicial de 5080 mg/kg, logrando alcanzar los resultados finales valores < a 1000 mg/kg.
- ❖ Se efectuó la caracterización físico-química y biológica del suelo antes de los tratamientos para conocer la concentración inicial de los contaminantes y sus requerimientos, para llevar a cabo un proceso eficiente.
- ❖ Las tres especies de hongos; *Aspergillus niger*, *Thichoderma Harzianum* y *Paecilomyces Lilacinus*, muestran gran eficiencia durante la degradación de los hidrocarburos en el suelo contaminado.
- ❖ El mayor desarrollo de crecimiento con las tres especies de hongos sobre suelo contaminado con petróleo, expresado en diámetro de colonias (cm) se dio con el uso del suelo Esterilizado.

RECOMENDACIONES

- ❖ Al momento de tomar las muestras del suelo realizarlas de una manera totalmente adecuada y posteriormente transportarlas correctamente al sitio donde se procederán a realizar los respectivos análisis.
- ❖ Probar biorremediación con microorganismos autóctonos propios de la zona para su mejor desarrollo.
- ❖ Obtener un banco de microorganismos para suelos contaminados con petróleo para procesos de biorremediación.
- ❖ Determinar la efectividad de microorganismos autóctonos introducidos con diferente grado de contaminación
- ❖ Para próximas investigaciones sobre suelos contaminados con petróleo mediante la utilización de microorganismos se recomienda realizar con diferentes especies de hongos para conocer su diferente efectividad que presentan.

GLOSARIO

PDA: Agar Papa Dextrosa

AA: Agar Avena

AN: Agar Nutritivo

AN: Aspergillus Niger

TH: Thichoderma Harzianum

PL: Pecilomyces Lilacinus

TPHs: Hidrocarburos Totales de Petróleo

pH: Coeficiente de acides o basicidad

Cd: Cadmio

Ni: Níquel

Pb: Plomo

msnm: Metros sobre el nivel del mar

DCA: Diseño experimental Completo al Azar

C1: Concentración 1

C2: Concentración 2

C3: Concentración 3

R1: Repetición 1

R2: Re2petición 1

R3: Repetición 3

M.O: Materia Orgánica

K: Potasio

P: Fósforo

Ca: Calcio

Mg: Magnesio

Zn: Zinc

Fe: Hierro

Mn: Manganese

NH₄: Amonio

UFC: Unidades formadoras de colonias

Cond. Elect: Conductividad Eléctrica

BIBLIOGRAFÍA

ALLEJO, GLORIA. Identificación de principales hongos filamentosos. *Revista Nova Scientia*. Perú : s.n., 2010. Vol. 16, N°3, pp. 35-50.

ARBOLEADA, VIVIANA & BRAVO, VERÓNICA. *Biorremediación del suelo contaminado con Hidrocarburos de la central hidroeléctrica del campamento Secoya mediante Landfarmig.* (Tesis Pregrado). Riobamba Ecuador : Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias, 2008. pp. 25 - 40. [Citado el: 17 de Diciembre de 2016.] Disponible en: <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/222/1/236T0006.pdf>.

ARIAS, ANA. *Suelos Tropicales*. Costa Rica : Universidad Estatal a Distancia, 2001. pp. 35-60.

BENAVIDES, JOAQUIN & LÓPEZ DE MEZA. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. [En línea] Enero - Junio de 2006. [Citado el: 26 de Noviembre de 2016.] Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/411/41140509.pdf>. 005.

BORGNA, ARMANDO. *Petróleo y gas Natural*. Argentina : Centro de Publicaciones UNL, 2001. pp. 30-40.

CAMPOS, IRENE. *Saniamiento Ambiental la Contaminación*. Costa Rica : EUNED, 2008. Vol. 13. pp. 50 - 60.

CEDEÑO, TERESA. *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Lima : Centro Internacional de la Papa, 2004. pp. 34-50.

DEVANEY, ERIK. Ventajas y desventajas del *Aspergillus niger*. *Ehow en España*. [En línea] 10 de Enero de 2010. [Citado el: 20 de Diciembre de 2016.] Disponible en: http://www.ehowenespanol.com/ventajas-desventajas-del-aspergillus-niger-lista_103103/.

FONTAINE, GUILLAUME. *Petróleo y Desarrollo sostenible en Ecuador*. Ecuador : Rispergraf S.A, 2004. pp. 35-60.

FOURNIER, LUIS. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Colombia 2005, Vol. 7, N°2 pp. 36-50.

GARCÍA, MIGUEL. *Las Estrategias Petroleras como un Instrumento de Reconfiguración Geopolítica.* México : Plaza y Valdes S.A, 2005. pp. 25-40.

GARCÍA, S. Ecuared.. [En línea] 16 de Noviembre de 2016. [Citado el: 25 de Noviembre de 2016.] Disponible en: https://www.ecured.cu/Paecilomyces_lilacinus.

GEFOR, JOSE. Paecilomyces lilacinus. [En línea] 16 de Mayo de 2011. [Citado el: 17 de Diciembre de 2016.] Disponible en: <http://www.gefor.4t.com/hongos/paecilomyceslilacinus.html>.

GONZÁLEZ, CARMEN & PASTOR ANA. Guía sobre suelos Contaminados. [En línea] CEPYME ARAGON, Mayo de 2007. [Citado el: 10 de Diciembre de 2016.] Disponible en: http://www.conectapyme.com/files/medio/guia_suelos_contaminados.pdf.

GUARRO, JOSÉ. Elsevier.es. [En línea] 5 de Septiembre de 2011. [Citado el: 14 de Diciembre de 2016.] Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-taxonomia-biologia-los-hongos-causantes-S0213005X11003016>.

GUTIÉRREZ, MARCEL. Biopelículas de Aspergillus niger para la producción de celulasas algunos aspectos estructurales y fisiológicos. Lima : *Revista Peruana de Biología*, 2003. Vol. 10, N°1, Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727-99332003000100009&script=sci_arttext&tlng=pt.

JARAMILLO, DANIEL. Introducción a la Ciencia del Suelo. Medellín, Universidad de Chile : Universidad Nacional de Colombia., 2005. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/2242/1/70060838.2002.pdf>.

JIMÉNEZ, ALBERTO. *Fundamentos de la Estructura del suelo.* México : Inca, 2010. pp. 35-50.

KONEMAN. *Diagnóstico Microbiológico.* España : Médica Panamericana, 2006. pp. 17-30.

LÓPEZ, MANUEL. *Molecular Biology and Genomics.* Madrid : Institute for Biological Resources, 2016. pp. 30 - 50.

MACAS, ALEXANDER. *Introducción a la Microbiología del Suelo.* México : Reimp, 1994. pp. 30 - 60.

MACHIN, JAIRO. Efecto de la Bioestimulación en la Biodegradación de Hidrocarburos de un suelo contaminado, en reactores de Fase Semisólida. México : s.n., 1999 . pp 365- 380.

MARTÍNEZ, JAIME. Hongos benéficos que controlan patógenos. [En línea] 03 de Junio de 2001. [Citado el: 10 de Diciembre de 2016.] Disponible en: <http://www.hortalizas.com/cultivos/chiles-pimientos/hongos-beneficos-controlan-patogenos-y-promueven-crecimiento/>.

MÉNDEZ, J. Hongo Thichoderma. *Hongo Trichoderma*. [En línea] 25 de 05 de 2007. [Citado el: 18 de Diciembre de 2016.] Disponible en: <http://archivo.infojardin.com/tema/hongo-trichoderma-articulo.39804/>.

MÉNDEZ, TOBAR. Departamento de Microbiología y Parasitología - Recursos en Micología. [En línea] 17 de Febrero de 2002. [Citado el: 20 de Diciembre de 2016.] Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/aspergilosis.html>.

MORENO, ERNESTO. *Manual para la Identificacion de Hongos*. México : Universidad Nacional Autónoma de México, 1988. pp. 45-60.

MOTAVARACHA SURAT, GUJARAT. Planet Biotech, India. [En línea] 2002-2004. [Citado el: 15 de Diciembre de 2016.] Disponible en: <https://www.indiamart.com/planet-biotech-india/biopesticide.html>.

PARRA, ENRIQUE. *Petroleo y Gas Natural*. España : akal, 2003. pp. 15-30.

PILAR, CABILDO. *Bases Quimicas del medio ambiente*. Madrid : Universidad Nacional de Educacion a Distancia, 2013. pp. 30-45.

RAOHE, 1215. *Reglamento Ambiental para Operaciones Hidrocarburíferas Ecuador ,Decreto 1215*. 2001.

ROMANIUK, ROMINA & BRANDT JUANFELIPE. Atenuación natural y Remedación inducida en suelos contaminados con hidrocarburos. [En línea] *Cienc. suelo*, Agosto - Diciembre de 2007. [Citado el: 15 de Diciembre de 2016.] Disponible en: https://www.ecured.cu/Suelo_contaminado_ISSN_1850-2067.

RUDA, ESTER. *Actividades Potencialmente Contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados*. Argentina : UNL, 2005. pp. 13 - 25.

SANTAS, P. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical. Berlin : s.n., 1997. pp. 677–686.

SERRAT, CAROLINA. *Formas Regionales de la influencia de la Explotación Petrolera.* Colombia : Cuadernos de casa chata 141, 2002. Disponible en:
<https://books.google.com.ec/books?id=Vw9afXo6l0AC&pg=PA175&lpg=PA175&dq=Formas+Regionales+de+la+influencia+de+la+Explotaci%C3%B3n+Petrolera&source=bl&ots=4kPwa9YzPN&sig=Z-5Xhvs-olYHxjazyKrfWxD9Q&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiX34D7l53TAhUMOSYKHc1>.

SILVA, ROSA MARIA. *Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos.* Cuba : s.n., 2008 . págs. pp. 44-51.

SURREY, KOZAKIEWICZ Z. *Aspergillus species on stored products.* México : International Mycological Institute, 1999. pp. 45-60.

TELLO, JOAQUIN. *El final de la era del Petróleo Barato.* Barcelona : Icaria, 2007. pp. 50-40.

TOREILLO, MIGUEL. *Hongos Microscópicos Saprobios y Parasitos.* México : Casa Abierta al Tiempo, 2002. pp. 20-50.

VANEGAS, MARCELA. 2009. Wordpress. *La contaminación Ambiental.* [En línea] Mayo . Julio de 2009. [Citado el: 16 de Diciembre de 2016.] Disponible en:
<https://vanesaloaiza.wordpress.com/tipos-y-causas-de-la-contaminacion-ambiental/>.

VEGA, MANUEL. *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo.* [En línea] 10 de Agosto de 2002. [Citado el: 15 de Diciembre de 2016.] Disponible en:
<http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Hongos/Ficha%20Aspergillus%20spp.pdf>.

ZABALA, JOEL & REYES, FRANCISCO. Derrames de Petróleo en Suelos y Adaptación de Pastos tropicales. *Revistas Científicas de América Latina.* Tabasco, México. s.l. : Universidad Autónoma Chapingo, 2005. Vol. 23, N°3. pp. 293-302.

ANEXOS

ANEXO A: Área contaminada



ANEXO B: Toma de muestra



Anexo C: Toma de muestras compuesta



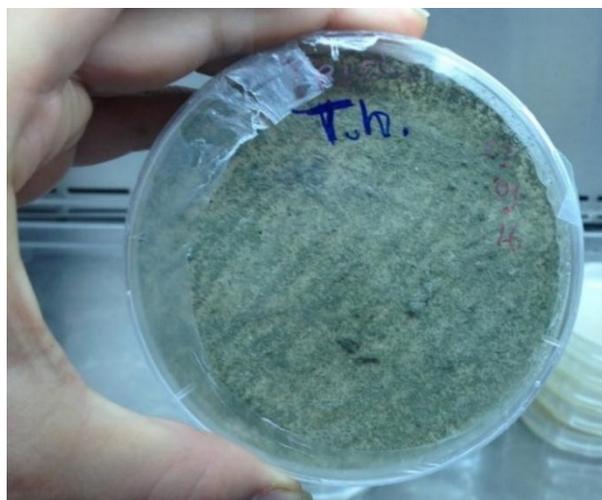
Anexo D: Muestras compuestas correctamente rotuladas



Anexo E: Hongo *Aspergillus Niger*



Anexo F: Hongo *Thichoderma Harzianum*



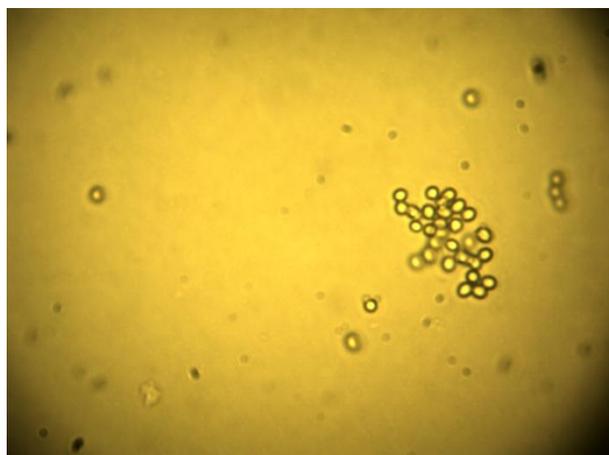
Anexo G: Hongo *Paecilomyces Lilacinus*



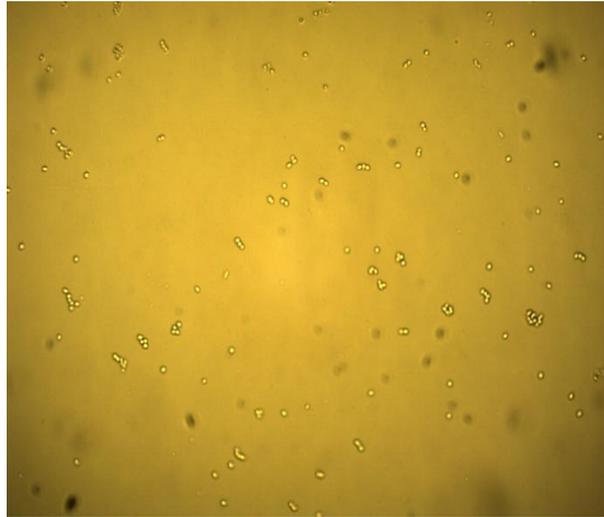
Anexo H: Esporas *Aspergillus Niger*



Anexo I: Esporas *Thichoderma Harzianum*



ANEXO J: Esporas *Paecilomyces Lilacinus*



ANEXO K: Resultados iniciales de los análisis de los TPHs



INFORME DE ENSAYO N°: 5644

Srta. **FERNANDA LOAIZA**.
Dirección: Parroquia San Carlos

SAS: 16-028

Fecha y hora de ingreso al laboratorio:	2015/10/17 15:16	Fecha final de Análisis	2015/10/19	T máx: 32°C T mín: 22°C
Toma de muestra:	Srta. Fernanda Loaiza	Fecha y Hora	2015/10/10	11:50

Código de Muestra: s 0518
Identificación: Suelo N° 1

Parámetros, métodos y resultados:

Parámetros	Método de Ensayo	Referencia	Uso Agrícola ²⁾	Uso Industrial ³⁾	Ecosistemas Sensibles ⁴⁾	Unidad ¹⁾	s 0518	Incertidumbre (K = 2)
Hidrocarburos totales	ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	< 1 000	mg/Kg	5 080	± 28%

Fuente: Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas, Decreto 1215, febrero del 2001:

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

- 1). Expresado en base de sustancia seca (gravimétrico; 105°C, 24 horas).
- 2). Valores límites permisibles enfocados en la protección de suelos y cultivos.
- 3). Valores límites permisibles para sitios de uso industrial (construcción, etc.).
- 4). Valores límites permisibles para la protección de ecosistemas sensibles tales como Patrimonio Nacional de Áreas Naturales y otros identificados en el correspondiente Estudio Ambiental.



Ing. Armando Meléndrez Lara.
DIRECTOR TÉCNICO

Francisco de Orellana, 19 de octubre de 2016.

Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE.

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

Calle Juan Huncite y Fray Gregorio de Alumina, detrás de Concesionario Mazda. Barrio Con Hogar.

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

MC2301-02

Página 1 de 1

ANEXO L: Resultados de los análisis Químicos y Físicos del suelo contaminado con petróleo.



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
LABORATORIO DE SUELOS**



Nombre del Propietario: María Fernanda Loayza

Fecha de ingreso: 03/10/2016

Ubicación:

La Joya de los Sachas

Fecha de salida: 07/11/2016

Nombre de la granja

Parroquia

Cantón

Fco. de Orellana

Provincia

RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DEL ANÁLISIS QUÍMICO DE SUELOS

Ident.	pH	mg/L			Meq/100g			ppm		
		% M.O	NH4	P	K	Ca	Mg	Zn	Mn	Fe
123	5.3 Lac.	4.0 M	8.5 B	11.1 B	0.64 A	4.1 B	2.8 M	2.2 B	10.1 B	267.6 A
124	5.4 Lac.	3.9 M	8.3 B	13.9 B	0.64 A	4.3 B	2.8 M	2.2 B	10.5 B	263.2 A

RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DEL ANÁLISIS FÍSICO DE SUELOS

Identificación	Textura	Estructura	Estab. estructural	%	w^s	g/cc		Consistencia		
				Poros	Cond. Eléct.	DA	DR	Seco	Húmedo	Mojado
123	Franco arenosa	Suelta	Baja	44.2	29.5	1.45	2.60	Suelto	Suelto	No plástico/no adherente
124	Franco arenosa	Suelta	Baja	42.3	23.3	1.50	2.63	Suelto	Suelto	No plástico/no adherente

Franklin Arcos T.
Ing. Franklin Arcos T.
JEFE LAB. DE SUELOS



CODIGO	
L. Alc. Ligeramente Alcalino	A: alto
N: Neutro	M: medio
L. Ac. Ligeramente ácido	B: bajo

Elizabeth Pachacama
Ing. Elizabeth Pachacama
TECNICO DE LABORATORIO

Dirección: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Panamericana Sur Km 14, Facultad de Recursos Naturales, Teléfono 2998220 Extensión 418
"Apoyando a la producción sana, rentable y sostenible con la naturaleza"

ANEXO M: Resultados finales de los análisis de los TPHs



INFORME DE ENSAYO N°: 6171

Srta. **FERNANDA LOAYZA.**
Dirección: Parroquia San Carlos

SAS: 17-02

Fecha y hora de ingreso al laboratorio:	2017/01/13 09:32	Fecha final de Análisis	2017/01/19	T máx: 32°C T mín: 22°C
Toma de muestra:	Srta. Fernanda Loayza.	Fecha y Hora	2017/01/12	10:00

Código de Muestra: s 0527
Identificación: Suelo, Código AN 10². 07/12/2016.

Parámetros, métodos y resultados:

Parámetros	Método de Ensayo	Referencia	Uso Agrícola ²⁾	Unidad ¹⁾	s 0527	Incertidumbre (K = 2)
*Hidrocarburos totales	ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	mg/Kg	796,2	~

Fuente: Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas. Decreto 1215, febrero del 2001;
Tabla # 6: Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicio.
2). Valores límites permisibles enfocados en la protección de suelos y cultivos.



Ing. Armando Meléndrez Lara.
DIRECTOR TÉCNICO

Francisco de Orellana, 19 de enero de 2017

Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE.
El informe sólo afecta a la muestra sometida a ensayo. Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio sin el permiso escrito del laboratorio
Calle Juan Huncite y Fray Gregorio de Alumina, detrás de Concesionario Mazda. Barrio Con Hogar.
e-mail: laboratorio@aqlabec.com · web: www.aqlabec.com Teléfono: (593) 6 2881715 Celular: 0991666858

MC2301-02

Página 1 de 1

INFORME DE ENSAYO N°: 6174

Srta. FERNANDA LOAYZA.
Dirección: Parroquia San Carlos

SAS: 17-02

Fecha y hora de ingreso al laboratorio:	2017/01/13 09:32	Fecha final de Análisis	2017/01/19	T máx: 32°C T mín: 22°C
Toma de muestra:	Srta. Fernanda Loayza.	Fecha y Hora	2017/01/12	10:00

Código de Muestra: s 0530

Identificación: Suelo, Código TH 10². 07/12/2016.

Parámetros, métodos y resultados:

Parámetros	Método de Ensayo	Referencia	Uso Agrícola ²⁾	Unidad ¹⁾	s 0530	Incertidumbre (K = 2)
*Hidrocarburos totales	ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	mg/Kg	85,2	~

Fuente: Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas, Decreto 1215, febrero del 2001;

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

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



Ing. Armando Meléndrez Lara.
DIRECTOR TÉCNICO



Francisco de Orellana, 19 de enero de 2017

Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE.

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

Calle Juan Huncite y Fray Gregorio de Aluminia, detrás de Concesionario Mazda. Barrio Con Hogar.

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

MC2301-02

Página 1 de 1