



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“COMPARACIÓN DE EFICIENCIA ENTRE *Pseudomonas aeruginosa* Y
Pseudomonas putida, Y SU MASIFICACIÓN PARA LA REMEDIACIÓN DE
HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO EN LOS PASIVOS
AMBIENTALES DE AQ-LAB EN PUERTO FRANCISCO DE ORELLANA”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORAS: BASTIDAS RIVADENEYRA JOHANNA ALEXANDRA

CEDEÑO RUBIANO ADRIANA ELIZABETH

TUTORA: DRA. NANCY VELOZ MAYORGA

Riobamba-Ecuador

2016

©2016, Johanna Alexandra Bastidas Rivadeneyra y Adriana Elizabeth Cedeño Rubiano

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 “COMPARACIÓN DE EFICIENCIA ENTRE *Pseudomonas aeruginosa* Y *Pseudomonas putida*, Y SU MASIFICACIÓN PARA LA REMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO EN LOS PASIVOS AMBIENTALES DE AQ-LAB EN PUERTO FRANCISCO DE ORELLANA” de responsabilidad de las señoritas: Johanna Alexandra Bastidas Rivadeneyra y Adriana Elizabeth Cedeño Rubiano, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

DRA. NANCY CECILIA VELOZ MAYORGA
DIRECTORA DEL TRABAJO DE _____
TITULACIÓN _____

ING. SOFIA CAROLINA GODOY PONCE
MIEMBRO DEL TRIBUNAL _____

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Nosotras, Johanna Alexandra Bastidas Rivadeneyra y Adriana Elizabeth Cedeño Rubiano declaramos que el presente trabajo de titulación es de nuestra 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 autoras asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba 15 de abril de 2016.

Johanna Alexandra Bastidas Rivadeneyra

210068402-2

Adriana Elizabeth Cedeño Rubiano

2200022031-3

DEDICATORIA

Al ser supremo de nuestra existencia, al arquitecto de nuestra vida Dios, no consigo palabras que transmitan cuan agradecida estoy por haberme dado la familia que tengo. Me apoyan y por eso les amo eternamente.

A mis padres por su infinito e incondicional amor brindado por más de 23 años. A Patricia, mi madre por ser mi confidente y consejera, sus sabias palabras han hecho una mejor versión de mi misma. En especial a mi padre Gustavo, por su gran ejemplo impartido y por ser el pilar fundamental en mi familia, impulsándonos a ser mejores personas, excelentes profesionales tratando siempre con respeto y humildad a nuestro prójimo.

A quien me ha apoyado en todas las circunstancias de mi vida, Maryta por ser mi hermana y a la vez mi amiga, espero siga adelante y jamás cambie su linda manera de ser.

A mis hermanos Alex, Kevin y Anderson, cuanto los amo, mi único propósito es que mis metas y logros les sirva de ejemplo para que ellos luchen por los suyos.

Johanna.

A mis padres, en especial a la mujer más sublime, valiente y amorosa que la vida me pudo obsequiar, mi madre. Por su infinito e incondicional amor, me enseñaron a valorar lo máspreciado y esencial de la existencia misma. La humildad.

A mis hermanos Alexander y Yuliana, ambos representan el motor que me ha impulsado a luchar por mis sueños, obligándolos a convertirse en metas realizables.

A mi familia, por recordarme cada día que sin Dios nada somos, que su tiempo es perfecto, y que todo llega si su voluntad así lo es.

Al ángel que decidió despojarse de su aureola y sus alas para descender y llenar mi vida de luz, Gareth Alessandro, cuanto te quiero sobrino.

Adriana.

AGRADECIMIENTO

La fe en Dios nos permite ver lo invisible, creer en lo increíble y recibir lo imposible. Dios tiene una razón para permitir que las cosas sucedan, puede que nunca entendamos su sabiduría pero tenemos que confiar en su voluntad. Por su infinita bondad y amor, Gracias.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en especial a nuestra querida Facultad de Ciencias, por todo el soporte académico y técnico impartido durante nuestra estadía en sus flamantes instalaciones. A cada uno de nuestros maestros por ser esa brújula propulsora de la curiosidad, el conocimiento y la sabiduría en nosotras, sus alumnas.

Agradecemos infinitamente a cada uno del personal que conforma el Laboratorio AQ-LAB, por el compromiso y apoyo a esta investigación en sus instalaciones, y por el financiamiento de la misma, facilitando nuestro trabajo, poniendo a nuestra disposición todos los recursos posibles.

En primer lugar quiero agradecer a Dios por haberme dado perseverancia para luchar por mis metas, sin sus bendiciones, el apoyo de mis padres y el de mis hermanos no hubiera sido posible estar aquí culminando mi carrera.

Un sincero agradecimiento a mis padres, muchos de mis logros se los debo a ustedes ya que me han motivado a ser mejor cada día y ser la motivación de mis hermanos.

Muchas fueron las personas que de forma directa o indirecta y aún sin saberlo me ayudaron mucho; aclarando mis dudas, poniendo a mi disposición sus conocimientos y apoyándome, no tendré como pagarles simplemente con un “Gracias”.

Johanna

Las palabras dejan atrás muchos sentimientos que no pueden expresarse. Por eso, de manera fugaz y sensata agradezco con las fuerzas que mi corazón proporciona a todas esas personas mágicas disfrazadas de normales, que disimulan su especial forma de ser.

A mis queridos padres. Alexander por ser mi amigo, mi confidente mi hermano, y por darme el mejor regalo de vida, mi sobrino. A mi pequeña hermana que con sus ocurrencias e imaginación hacen de mi existencia, un espacio más placentero. A mi familia. A cada uno de mis amigos, quienes hicieron de mi vida estudiantil un camino jovial y ameno. Gracias por acompañarme en este viaje.

Adriana

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xvi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMEN.....	xviii
SUMMARY.....	xix
CAPÍTULO I	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.Situación problemática.....	1
1.2.Formulación del Problema.....	2
1.3.Justificación.....	2
1.4.Objetivos de la Investigación.....	4
1.4.1.Objetivo General.....	4
1.4.2.Objetivos Específicos.....	4
CAPÍTULO II	
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1.Antecedentes.....	5
2.2.Base Teórica.....	7
2.2.1.Hidrocarburos Totales de petróleo (TPHs).....	7
2.2.2.Pasivos ambientales.....	10
2.2.2.1.Lodos de fondos de tanque.....	12
2.2.3.Remediación de suelos contaminados con TPHs.....	12
2.2.4.Biorremediación.....	13
2.2.4.1.Tipos de biorremediación.....	14
2.2.4.1.1.Remediación microbiana.....	15
2.2.4.1.2.Bioestimulación.....	15
2.2.4.1.3.Bioventeo.....	15
2.2.4.1.4.Bioaumentación.....	15
2.2.4.1.5.Compostaje.....	15
2.2.4.1.6.Landfarming.....	16
2.2.5.Importancia de los microorganismos en la degradación de TPHs.....	23
2.2.5.1.Microorganismos degradadores de Hidrocarburos en Pasivos Ambientales.....	23
2.2.6.Pseudomonas.....	27
2.2.7.Pseudomona aeruginosa y Pseudomona putida.....	30

2.2.8.Masificación.....	34
2.2.9.Marco Legal	34
CAPÍTULO III	
3.METODOLOGÍA	36
3.1.Marco Metodológico:.....	36
3.1.1.Ubicación:	36
3.1.2.Descripción del sitio de trabajo:.....	37
3.1.3.Tipo y Diseño de Investigación:	37
3.1.4.Unidad de Análisis	38
3.1.5.Población de Estudio.....	38
3.1.6.Tamaño de Muestra.....	38
3.1.7.Selección de muestra.....	38
3.1.8.Técnicas de Recolección de Datos	38
a. Observación directa de los hechos:	38
b. Análisis de laboratorio:	38
3.2.Parte Experimental	39
3.2.1.Caracterización físico-química y microbiológica:	39
3.2.2.Comparación de eficiencia de degradación de TPHs:.....	39
3.2.2.1.Construcción del Invernadero	39
3.2.2.2.Transporte de muestras al invernadero.....	40
3.2.2.3.Codificación de muestras	40
3.2.2.4.Activación de cepas.....	42
3.2.2.5.Selección de la <i>Pseudomona</i> más eficiente.....	42
3.2.2.6.Masificación de <i>Pseudomona putida</i>	43
3.2.2.7.Conservación de <i>Pseudomona aeruginosa</i> y <i>Pseudomona putida</i>	44
3.2.3.Técnica de Lanfarming	44
3.2.3.1.Cálculo de dosificación de nutrientes.....	45
3.2.4.Comparación con la Legislación vigente en el Ecuador:	49
3.2.5.Metodología para la elaboración del Manual de Procedimiento:.....	49
CAPÍTULO IV	
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
4.1. Caracterización físico-química y microbiológica:	50
4.2. Comparación de eficiencia de degradación de TPHs:.....	52
4.2.1.Resultados de los análisis de la caja código 1	53
4.2.2.Resultados de los análisis de la caja código 1a	53
4.2.3.Resultados de los análisis de la caja código 1b.....	56
4.2.4.Resultados de los análisis de la caja código 1c	59

4.2.5.Resultados de los análisis de la caja código 1d.....	63
4.2.6.Resultados de los análisis de la caja código 1e	64
4.2.7.Resultados de los análisis de la caja código 2.....	66
4.2.8.Resultados de los análisis de la caja código 2a	68
4.2.9.Resultados de los análisis de la caja código 2b.....	71
4.2.10.Resultados de los análisis de la caja código 2c	74
4.2.11.Resultados de los análisis de la caja código 2d.....	76
4.2.12.Resultados de los análisis de la caja código 2e	79
4.2.13.Resultados de los análisis del suelo patrón.	81
4.2.14.Activación de cepas.....	84
4.2.15.Selección de la P. más eficiente.	85
4.2.16.Resultados de la comparación de eficiencia de las cajas con el programa IBM SPSS: ...	86
4.3.Técnica Landfarming	88
4.3.1.Resultados de los análisis de la relación de nutrientes.....	88
4.4.Discusión de Resultados:	88
CONCLUSIONES	91
RECOMENDACIONES.....	92
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 – 2: Tipos de Pasivos Ambientales Flujo.....	11
Tabla 2 – 2: Temperaturas en °C para el crecimiento de algunas especies.....	22
Tabla 3 - 2: Composición estimada de bacterias de suelo en buen estado.....	24
Tabla 4 – 2: Microorganismos reportados como degradadores de Petróleo tanto en sistemas acuáticos como terrestres	25
Tabla 5 - 2: Otros organismos degradadores.....	27
Tabla 1 - 3: Fechas de análisis	42
Tabla 2 - 3: Valores que utiliza el programa IBM SPSS.....	43
Tabla 3 - 3: Tiempo de Control de parámetros de tratamiento en cajas experimentales.	48
Tabla 4 - 3: Tiempo de Control de parámetros de tratamiento al suelo patrón.....	48
Tabla 1 - 4: Análisis iniciales físico-químicos y microbiológicos	50
Tabla 2 - 4: Análisis intermedios físico-químicos y microbiológicos	51
Tabla 3 - 4: Análisis finales físico-químicos y microbiológicos.....	51
Tabla 4 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 1	51
Tabla 5 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 1a.....	54
Tabla 6 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 1b	56
Tabla 7 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 1c.....	59
Tabla 8 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 1d	61
Tabla 9 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 1e.....	64
Tabla 10 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 2	66
Tabla 11 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 2a	69
Tabla 12 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 2b	71
Tabla 13 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 2c	74
Tabla 14 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 2d	77
Tabla 15 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 2e	79
Tabla 16 - 4: Resultados de los análisis del suelo patrón.....	82
Tabla 17 - 4: Resultado de Recuento Microbiológico en cajas experimentales.....	85
Tabla 18 - 4: Resultado del porcentaje de eficiencia de las cajas sin adicionarles las cepas	86
Tabla 19 - 4: Resultado del porcentaje de eficiencia de las cajas adicionándole las cepas.....	86
Tabla 20 - 4: Resultado de la comparación.....	87
Tabla 21 - 4: Comparación de medias	87

TABLA DE FIGURAS

Figura 1 - 2: Análisis SARA.....	9
Figura 2 - 2: Pasivos ambientales en la comunidad indígena del Ecuador	11
Figura 3 - 2: Degradación de hidrocarburos alifáticos en presencia de oxígeno	19
Figura 4 - 2: Supervivencia de algunos microorganismos en diferentes medios.....	21
Figura 5 - 2: Relación humedad/temperatura.....	23
Figura 6 - 2: Colonias de <i>Pseudomonas</i> sobre un medio de cultivo de agar sangre, se observa una coloración gris-plata en la superficie del crecimiento bacteriano.	29
Figura 7 - 2: Vista macroscópica de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en Agar Cetrimide.....	31
Figura 1 - 3: Ubicación del AqLab	37

TABLA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - 3: 6 cajas con <i>Pseudomona aeruginosa</i> siguientes códigos 1, 1a, 1, 1c, 1d, y 1e. ...	40
Gráfico 2 -3: Codificación de cajas experimentales	41
Gráfico 1 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1.	52
Gráfico 2 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1.	52
Gráfico 3 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1.	53
Gráfico 4 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1..	53
Gráfico 5 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1a.	54
Gráfico 6 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1a.....	55
Gráfico 7 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1a.....	55
Gráfico 8 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1a.....	56
Gráfico 9 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1b.	57
Gráfico 10 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1b.	57
Gráfico 11 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1b.	58
Gráfico 12 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1b.	58
Gráfico 13 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1c.	59
Gráfico 14 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1c.....	60
Gráfico 15 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1c.....	60

Gráfico 16 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1c.....	61
Gráfico 17 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1d.	62
Gráfico 18 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1d.	62
Gráfico 19 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1d.	63
Gráfico 20 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1d.	63
Gráfico 21 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1e.	64
Gráfico 22 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1e.....	65
Gráfico 23 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1e.....	65
Gráfico 24 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1e.....	66
Gráfico 25 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2.	67
Gráfico 26 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2.	67
Gráfico 27 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2.	68
Gráfico 28 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2.	68
Gráfico 29 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2a.	69
Gráfico 30 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2a.....	70
Gráfico 31 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2a.....	70
Gráfico 32 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2a.....	71
Gráfico 33 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2b.	72

Gráfico 34 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2b.	72
Gráfico 35 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2b.	73
Gráfico 36 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2b.	74
Gráfico 37 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2c.	75
Gráfico 38 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2c.	75
Gráfico 39 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1d.	76
Gráfico 40 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2c.	76
Gráfico 41 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2d.	77
Gráfico 42 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2d.	78
Gráfico 43 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2d.	78
Gráfico 44 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2d.	79
Gráfico 45 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2e.	80
Gráfico 46 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2e.	80
Gráfico 47 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2e.	81
Gráfico 48 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2e.	82
Gráfico 49 - 4: Valores de pH durante la aplicación de la Técnica de Landfarming en el suelo patrón.	83
Gráfico 50 - 4: Valores de Temperatura durante la aplicación de la Técnica de Landfarming en el suelo patrón.	83
Gráfico 51 - 4: Valores de Humedad durante la aplicación de la Técnica de Landfarming en el suelo patrón.	84

Gráfico 52 - 4: Concentración de TPHs durante la aplicación de la Técnica de Landfarming en el suelo patrón.	84
Gráfico 53 - 4: Comparación de eficiencia.	88

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** Aval dirigido desde Dirección de Escuela al Laboratorio AqLab
- ANEXO B:** Resultados de análisis físico-químicos de los residuos de fondos de tanque
- ANEXO C:** Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas del Ecuador, RAOHE, Decreto Ejecutivo 1215.
- ANEXO D:** Construcción del invernadero
- ANEXO E:** Cepas
- ANEXO E:1** Preparación del Agar PCA
- ANEXO E:2** Preparación del agua de Peptona
- ANEXO E:3** Método Uno
- ANEXO E:4** Activación de cepa
- ANEXO E:5** Masificación de *Pseudomonas putida*
- ANEXO E:6** Conservación de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida* (CRIOBIALES)
- ANEXO F:** Análisis de TPHs
- ANEXO G:** Técnica de Landfarming
- ANEXO H:** Muestreo Aleatorio simple
- ANEXO I:** Disposición final
- ANEXO J:** Informes de Control de calidad
- ANEXO K:** Certificados de *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*
- ANEXO H:** Manual de Procedimientos

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Cd	Cadmio
HAPs	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
Ni	Níquel
Pb	Plomo
TPHs	Hidrocarburos Totales de Petróleo
EPA	Environmental Protection Agency (USA)
mg/kg	Miligramo por kilogramo
Ppm	Partes por millón
RAOHE	Reglamento Ambiental para las operaciones Hidrocarburíferas del Ecuador
PA	Pasivo Ambiental
Ph	Potencial de Hidrógeno
SARA	Saturados, Aromáticos, Resinas y Asfaltos
UFC/g	Unidad formadora de Colonia por gramo
m.o	Microorganismo
°C	Grados centígrados
CO₂	Dióxido de Carbono
C	Carbono
N	Nitrógeno
P	Fósforo
K	Potasio
H₂O	Agua
COVs	Compuestos Orgánicos Volátiles

RESUMEN

El propósito de esta investigación fue evaluar la eficiencia de degradación de Hidrocarburos Totales de Petróleo [TPHs], entre *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*, y su masificación para la remediación de pasivos ambientales mediante la técnica de Landfarming en AqLab en Puerto Francisco de Orellana. Se comparó la eficiencia en 12 cajas experimentales, dos blancos fueron codificados con 1 y 2, las 10 restantes divididas en: 1a, 1b, 1c, 1d y 1e con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442^{TM*} mientras que 2a, 2b, 2c, 2d, y 2e con *Pseudomonas putida* ATCC 31483^{TM*}, mediante análisis de laboratorio tomando en cuenta los parámetros de control: pH, temperatura y humedad. Como resultado se obtuvo que en las cajas 1a y 2e presentó una eficiencia de 89,8% mientras que en la 2c con un 94%. Para la degradación de TPHs se masificó e inoculó la *Pseudomonas putida* en el suelo patrón estimulando el tratamiento con la técnica de Landfarming consiguiendo una degradación de 132 630,66 mg/kg a 2400 mg/kg efectuando la disposición final con referencia a los límites permisibles de la tabla 6, Uso Agrícola del Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas del Ecuador [RAOHE], al obtener una tasa de degradabilidad de TPHs de 98,24 %. Concluyendo que numéricamente *Pseudomonas putida* es más eficiente que *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo al comparar con ANOVA de un factor independiente, las eficiencias son estadísticamente iguales. Se recomienda que para próximas investigaciones se realice la comparación con especies diferentes.

Palabras Clave: <BACTERIA [*Pseudomonas aeruginosa*]>, <BACTERIA [*Pseudomonas putida*]>, <HIDROCARBURO TOTALES DE PETRÓLEO [TPHs]>, <MASIFICACIÓN MICROBIANA>, <DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS>, <PASIVOS AMBIENTALES>, <BIORREMEDIACIÓN>, <TÉCNICA LANDFARMING>.

SUMARY

This research is intended to evaluate the efficiency of total petroleum hydrocarbon degradation TPHs, through the *Pseudomonas aeruginosa* and the *Pseudomonas putida* and their massification for the environmental liabilities remediation from the Landfarming technique applied in the AqLab from Puerto Francisco de Orellana. Throughout this study laboratory analysis, the efficiency of 12 experimental cases were tested by codifying two of them like the study aim as 1 and 2, the other ten cases were divided by two as 1a, 1b, 1c, 1d and 1e for the *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442^{TM*} treatment, and 2a, 2b, 2c, 2d, 2e for the *Pseudomonas putida* ATCC 31483^{TM*} treatment, in regarding the pH, temperature and wetness parameters. Which results. Which results accounts for an efficiency of 89,8% in the 1a and 2e experimental cases whereas it increases to 94% in the 2c experimental case. The TPHs degradation was carried out through *Pseudomonas putida* massification which were inoculated into the soil sample stimulated by applying the Landfarming technique that gave a degradation of 123630,66 mg/Kg – 2400 mg/Kg considering the final disposition in regarding the limit parameters stated on the Chart 6, concerning with Environmental Regulation on Ecuadorian Hydrocarbon Operations and Agriculture (RAOHE) of Ecuadorian Legislation, from which the TPHs degradation rate accounted for 98,24%. Therefore, we can conclude that the *Pseudomonas putida* is more efficient than *Pseudomonas aeruginosa* but comparing them with ANOVA as an independent factor, the efficiency of both treatments is statistically equal. Thus, for further researches is advisable to make a comparison of treatments from other different species.

Research Key Words: < *Pseudomonas aeruginosa* Bacterium >, < *Pseudomonas putida* Bacterium>, < Total Petroleum Hydrocarbon TPHs >, <Microbial Degradation >, <Degradation of Hydrocarbon >, < Environmental Liabilities >, < Bioremediation >, <Landfarming technique>

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación problemática

En Puerto Francisco de Orellana una de las principales actividades que mueve la economía en la zona es la explotación del oro negro, surgiendo consigo la formación de una serie de pasivos ambientales, los mismos que exigen un adecuado tratamiento para poder darles una disposición final responsable a fin con la legislación vigente en el país.

Uno de los principales problemas asociados a la remediación ambiental es el tiempo y la capacidad de llegar a niveles exigidos por la ley, en nuestro país se rige en el Decreto Ejecutivo 1215 RAOHE. Entre todos los procesos que se emplean para la limpieza de suelos contaminados en la Región Amazónica, debido a la biodisponibilidad de estos, la técnica más empleada es la biorremediación.

La contaminación generada por el manejo inadecuado y poco responsable de los residuos del petróleo y sus derivados representan un problema alarmante, involucrándonos directa e indirectamente a todos, por ello a través del tiempo se han estudiado una serie de soluciones tecnológicas y naturales las mismas que tienden a variar de una zona a otra. Se ha desarrollado tecnologías de biorremediación como alternativas amigables con el medio ambiente para la recuperación de ecosistemas y agro-ecosistemas impactados negativamente, proceso que es importante porque se toma en cuenta las propiedades de la zona en donde se realizará el tratamiento sobre todo las temperaturas elevadas y la alta precipitación.

El vertido de hidrocarburos totales de petróleo, en ecosistemas acuáticos y terrestres representa uno de los problemas de contaminación ambiental más drásticos y a diario en todas las extensiones del planeta. Tratar estos residuos representa una serie de problemas severos que se reportan tanto económicos como sociales para las compañías ajenas a la remediación ambiental como es el caso de los laboratorios. Por esta razón, es necesaria la búsqueda y aplicación de

procesos in situ, accesibles en costos y tiempo proporcionando una solución ambientalmente segura y efectiva para la remediación de suelos contaminados con petróleo.

La biodegradación de TPHs es un parámetro que puede verse afectado por las condiciones ambientales que posee el medio o sitio contaminado, o puede ser también la zona a tratarse, por este motivo es indispensable controlarlas, esto se efectúa con la finalidad de que la actividad de los microorganismos degradadores sea más eficiente.

Además de la actividad específica, las *Pseudomonas* poseen la capacidad degradadora de contaminantes en un pasivo ambiental, específicamente derivado de la contaminación efectuada por la explotación del petróleo. La escasa información que existe acerca de su comportamiento dentro de nuestra zona de estudio.

1.2. Formulación del Problema

¿Cuál de las dos especies *Pseudomona aeruginosa* o *Pseudomona putida*, es más eficiente para degradar hidrocarburos totales de petróleo en las muestras de pasivos ambientales del laboratorio AQ-LAB en Puerto Francisco de Orellana?

1.3. Justificación

La actividad hidrocarburífera dentro de nuestro país, ha desencadenado una serie de problemas ambientales, entre los que principalmente se encuentran la formación de pasivos ambientales los cuales representan un conjunto de daños ambientales, en términos de contaminación del agua, del suelo, del aire (por la eliminación al ambiente de desechos tóxicos), el deterioro de los recursos y de los ecosistemas, producidos por una empresa en su funcionamiento normal o por accidentes imprevistos, a lo largo de su historia. (Alier, 2003)

En esta investigación se ha planteado la comparación de eficiencia de dos géneros de bacterias, *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona putida*. Estas bacterias emplean una gran cantidad de compuestos de diferentes orígenes, los mismos que los pueden emplear ya sean como sustratos o simplemente intermediarios de una reacción catalítica, incluyendo además compuestos más difíciles de degradar como es el caso de los aromáticos, derivados halogenados así como una gran variedad de residuos orgánicos recalcitrantes. (Ogram, 1997)

Desde un punto de vista de remediación ambiental el papel de las *Pseudomonas* es altamente efectivo en la descomposición de algunos contaminantes, pero cabe mencionar que estudios han reportado que también pueden producir efectos adversos dado donde el papel de las *Pseudomonas* se ve reflejado en que algunas especies tienen gran importancia fitopatogénica, así como otros presentan toxicidad en humanos y animales (Morrison, 1984. Págs. 627-642).

La realización de esta investigación promueve el análisis del entorno de desarrollo de las especies y sus interacciones con el medio, pues al mismo tiempo que se genera investigación científica acerca del comportamiento del hidrocarburo frente a la acción de *Pseudomona putida* y *Pseudomona aeruginosa*; se involucra también el tratamiento de pasivos generados por los análisis de las diferentes muestras del laboratorio AqLab.

AqLab es un laboratorio ubicado en la Provincia de Orellana en la ciudad del Coca el mismo que se encarga del análisis y evaluación ambiental de diferentes componentes como suelo, agua y aire. Al realizar esta actividad de manera continua se producen una serie de desechos siendo el principal inconveniente al momento de disponerlos luego de haberles realizado los respectivos análisis solicitados por las empresas o compañías petroleras.

Por medio del empleo de la biotecnología a través de técnicas microbiológicas se identificará la especie de *Pseudomona* más eficiente que permitirá mejorar y acelerar la degradación de hidrocarburos Totales de Petróleo presentes en las muestras de estudio, empleando la técnica de Landfarming, para el control de variables que influyen directamente en la eficiencia del tratamiento.

La selectividad de los dos géneros a aplicar en este estudio se basa en la accesibilidad de las mismas, su bajo costo en el mercado y su tiempo de incubación corto a través del método más sencillo de activación de cepas. Las especies de *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona putida* son identificadas como bacterias con alto potencial degradador, las mismas que podrían ser empleadas en la recuperación y remediación de ecosistemas afectados en diferentes zonas de nuestra Amazonía ecuatoriana, por tal motivo la selección de este género microbiano es fundamental para el desempeño de la propuesta, considerando que cada pasivo ambiental cuenta con su actividad microbiana autóctona. Es indispensable para el laboratorio disponer con un sistema uniforme de tratamiento de pasivos ambientales con la finalidad de cumplir con la legislación vigente en el país.

1.4. Objetivos de la Investigación

1.4.1. Objetivo General

- Comparar la eficiencia entre *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona putida*, y su masificación para la biodegradación de Hidrocarburos Totales de Petróleo en los pasivos ambientales de AQ-LAB en Puerto Francisco de Orellana.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar parámetros físicos-químicos y microbiológicos de los pasivos ambientales.
- Comparar la eficiencia de degradabilidad de Hidrocarburos Totales de Petróleo entre *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona putida* en muestras pilotos.
- Masificar la bacteria con mayor eficiencia en la degradación de Hidrocarburos Totales de Petróleo.
- Estimular el proceso de degradación de Hidrocarburo en los pasivos ambientales con el uso de la técnica de Landfarming.
- Establecer un protocolo de tratamiento a seguir para la remediación definiendo tiempos de tratamiento y los parámetros de control.

CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Francisco de Orellana es una de las ciudades de la Amazonia ecuatoriana con campos petroleros con mayor productividad junto a Lago Agrio, Shushufindi y Sacha. Esto conlleva a que grandes, medianas y pequeñas empresas remediadoras se dediquen a los tratamientos y restauración de todos los pasivos ambientales que se generan por las actividades hidrocarburíferas de la zona. Los costos de tratamiento por parte de estas son elevados, por ello algunos laboratorios encargados de efectuar los análisis y evaluaciones de la calidad ambiental de estas muestras, han optado por implementar sus propios sistemas de tratamiento internos.

En Ecuador, pocos son los estudios que se han enfocado a nivel nacional a la reparación de pasivos ambientales. Sin embargo, el Ministerio del Ambiente (MAE) a partir del año 2009, se comprometió en la elaboración de Planes de remediación. Para esto se constituyó el Plan de Reparación Ambiental y Social (PRAS), el cual interviene en áreas afectadas por la actividad hidrocarburífera. Este programa tiene un alcance nacional, es decir, considera todas las áreas donde existe presencia de infraestructura petrolera en el país. (PRAS, 2009).

Se estima que en un gramo de suelo en buen estado de desarrollo para proliferar la vida se puede encontrar hasta 600 millones de bacterias las cuales se pueden clasificar entre 15 mil y 20 mil especies distintas. (Ogram, 1997)

Algunas investigaciones a través del tiempo se relatan a continuación:

Lopólito M. y otros. 2005. Llevaron a cabo experimentos de biodegradación de hidrocarburos utilizando diferentes sustratos como el petróleo, kerosene, aceite lubricante y benceno, y como

nutriente un medio mínimo y fertilizante foliar comercial, concluyendo que la inoculación previa acelera el proceso de degradación.

Morgan M. y otros. 2005. Aplicaron biorremediación en 20 m² de suelo contaminado con petróleo, durante 369 días, en este suelo se adicionaron nutrientes inorgánicos, aireación y humedad, obteniéndose valores < a 1% de concentración de hidrocarburos recomendada por normas internacionales.

Ávalos A. y otros. 2004. Estudiaron los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* AT10, determinando que la adición de los mismos, acelera la biodegradación de hidrocarburos del petróleo en un 61% en 10 días de incubación.

Bracho M. y otros. 2004. Llevaron a cabo un estudio respecto a la degradación bacteriana sobre naftaleno, antraceno, fenantreno y dibenzotiofeno. Las bacterias degradadoras aisladas a partir del suelo estudiado fueron: *Pseudomonas* (54.05%), *Bacillus* (24.30%), *Staphylococcus* (16.20 %) y *Micrococcus* (5.4 %); además determinaron que el 100% de cepas, degradaron el naftaleno y antraceno, el 78.5% fenantreno, el 71.42% dibenzotiofeno y 50% los cuatro hidrocarburos.

Pardo J. y otros. 2004. Midieron la efectividad de la biolabranza (Landfarming), durante 4 meses, adicionando fertilizantes inorgánicos, obteniendo al finalizar el experimento, un porcentaje de remoción de hidrocarburos del 91%.

Zucchi M. y otros. 2003. Evaluaron la respuesta de una comunidad bacteriana durante la biorremediación en un lapso de 72 días con bioestimulación y aireación adecuada, adición de nutrientes y surfactantes obteniendo una reducción final de hidrocarburos del 39.5%.

En 1997, Christon realizó algunos experimentos con microorganismos, los cuales dieron como resultado una serie de investigaciones reales en donde se evidenció una disminución aproximada al 95% de hidrocarburo, manipulados con la adición de consorcios de microorganismos al área de tratamiento, mientras que en los campos y áreas no tratados la reducción apenas se representó en un 14%, y si a esto le añadimos los respectivos nutrientes el proceso se aceleraba en un periodo de tres veces, ya que la adición de nutrientes promueve la biodegradación al aumentar las poblaciones microbianas y la formación de microemulsiones al controlar el parámetro de la humedad la relación agua-aceite provoca un eficaz proceso con respecto a la reducción de la viscosidad y tensión superficial, lo cual a su vez aumenta la disponibilidad del sustrato (Swannell *et al.*, 1996).

Nwachukwu S. 2001. Inoculó *Pseudomonas putida* en suelos contaminados con petróleo, adicionando nutrientes inorgánicos en algunos. La mayor efectividad de degradación se obtuvo

a las 9 semanas, esto se corroboró por el crecimiento de *Lepidium sp.*, usado como evidencia de biorecuperación; el porcentaje de germinación de éste, fue de 27,5% en suelos no fertilizados y de 98,8% en suelos fertilizados.

Parales R. el año 2000. Evaluó la capacidad degradativa y reacción quimio táctica de cinco cepas, determinando que *Pseudomonas putida*, degrada de manera eficaz los hidrocarburos.

Dagher F. y otros. 1997. Realizaron un estudio comparativo de 5 cepas del suelo degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos; *Sphingomonas* fue la cepa con mayor capacidad degradadora, seguida de *Pseudomonas aeruginosa*. Los biosurfactantes fueron producidos por *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida* y el bioemulsificante por *Sphingomonas sp.*

En los últimos años través de una serie de investigaciones se ha incrementado el interés en el uso de biotecnologías destinadas a restaurar o recuperar suelos contaminados con petróleo, que complementen los métodos químicos y físicos tradicionales. Se realiza por medio del empleo de diferentes organismos vivos ya sean bacterias, hongos y algunas clases de plantas.

Entre los géneros de bacterias más utilizados encontramos géneros de *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Rhodotorula* y *Sporobolomice*. (Johsen et al. 2002).

2.2. Base Teórica

2.2.1. Hidrocarburos Totales de petróleo (TPHs)

Es aceitoso y de color negro viscoso desde el punto de vista químico y su composición compleja entre los cuales tenemos a los hidrocarburos aromáticos, parafinas, cicloparafinas, naftalenos, asfaltenos. Entre los compuestos orgánicos e inorgánicos tenemos al azufre, nitrógeno y oxígeno (Eweis, et al. 1999, Págs. ,25-37).

En los procesos de refinación y tratamiento químico se forma las olefinas como las diolefinas aunque o se encuentra en el petróleo. Las fracciones más pesadas del petróleo son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP`s), los más representativos son: Naftaleno,

Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Benzo (a) antraceno, entre otros (US-EPA, 2003).

Los compuestos que se presenta en estado gaseoso a temperatura ambiente son los Compuestos Orgánicos Volátiles (COV`s), presentan una cadena con un número de carbonos inferiores a doce y los más abundantes en el aire so: metano, etano, benceno, tolueno.

Los efectos más graves de la contaminación ocurren cuando la entrada de sustancias (naturales o sintéticas) al ambiente rebasa la capacidad de los ecosistemas para asimilarlas y/o degradarlas (EPA, 2011. Disponible en: <http://www.epa.gov/iaq/voc.html>).

2.2.1.1. Los TPHs como agente contaminante

La compleja composición química de los TPHs, se caracteriza por ser persistente y por tener la capacidad para bioacumularse. La persistencia es relacionada a la viscosidad, la adherencia y la capacidad de este compuesto para ser evaporado (Nomack, 2010, Págs. 232-240).

Por lo tanto, los TPHs grandes y viscosos son los más difíciles de degradarse por su hidrofobicidad y por su poca biodisponibilidad (Balba, et al, 1998, Págs.155-164).

La persistencia de este compuesto se ha reportado ampliamente en derrames que han sucedido alrededor del mundo. Cabe indicar que el crudo puede volatilizarse o ser foto-oxidado, pero su rango de hidrólisis es bastante bajo porque los hidrocarburos que lo conforman no cuentan con grupos funcionales que puedan ser degradados bajo condiciones ambientales (US EPA, 2011).

El término “Hidrocarburos totales de petróleo [abreviados TPH en inglés], describen una gran familia de varios cientos de compuestos químicos originados de petróleo crudo; éste término es usado para manufacturar los productos de petróleo, los que pueden contaminar el ambiente” (Universidad de Antofagasta, 2005, Pag.3).

Las sustancias químicas que pueden encontrarse en los TPHs son: hexano, aceites minerales, benceno, tolueno, xilenos, naftalina, y fluoreno, y también otros productos de petróleo y componentes de gasolina. Es probable que muestras de TPHs contengan solamente algunas o una mezcla de estas sustancias químicas. (Universidad de Antofagasta, 2005, Pag.3).

Todos los petróleos crudos tienen concentraciones bajas de metales pesados de origen natural, y los metales son componentes naturales de la formación de las rocas y que han sido incorporados en el petróleo durante la formación del mismo, en la forma de moléculas orgánicas que contienen metales. (Universidad de Antofagasta, 2005, Pag.3).

2.2.1.2. Estructura química de las distintas familias de hidrocarburos del petróleo

Los compuestos de mayor facilidad para los organismos remediadores pueden interferir son los n-alcenos y los alcanos ramificados (isoprenoides) de cadena intermedia (C10-C20) debido a que poseen mayor tendencia a ser eficazmente biodegradados. Por ende se puede concluir que aquellos que poseen cadenas carbonadas más largas (> C20), y al poseer elevados pesos moleculares y baja solubilidad en agua son más difíciles de degradar.

Por ejemplo, los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs) que poseen de 2 a 3 anillos tienden ser biodegradados con mayor eficacia en un suelo en condiciones ambientalmente óptimas, así mismo aquellos de 4 anillos, y especialmente, los de 5 o más anillos bencénicos presentan una mayor recalcitrancia y una baja solubilidad. Las fracciones de resinas y asfaltenos son las que presentan una menor degradabilidad debido a las complejas estructuras químicas y a su elevado peso molecular. (Harayama et al, 1999. Págs.: 63-70).

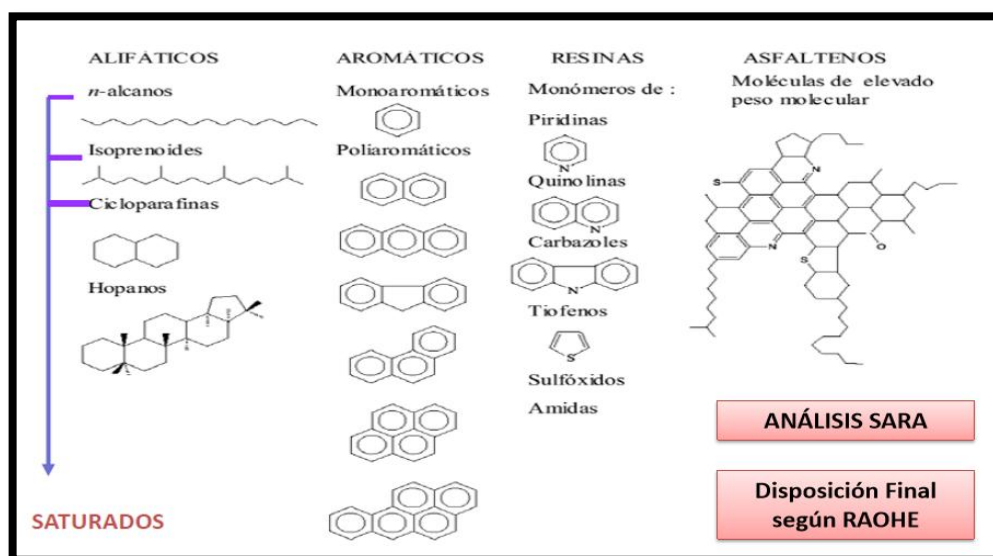


Figura 1 - 2: Análisis SARA.

Fuente: Harayama, 1999

2.2.1.3. Degradación de TPH

Como señala Galan (2004), el proceso de degradación del petróleo y la velocidad de su degradación está influenciada por varios factores como son: luz, temperatura, tipo y número de sustancias, orgánicas e inorgánicas que contiene el medio y las condiciones climáticas. Estos factores afectan a la actividad microbiana, a la evaporación, a la disolución, a la dispersión y a los procesos de sedimentación. Las fracciones más tóxicas son generalmente las menos susceptibles a la degradación microbiana.

Ewies (1999) señala que, los asfaltos y resinas son compuestos de alto peso molecular que contienen nitrógeno, azufre y oxígeno; tienen una estructura compleja compuesta de cadenas de hidrocarburos, nitrógeno, azufre, y átomos de oxígeno ligados a ramificaciones de policíclicos aromáticos los cuales incluyen níquel y vanadio. Los compuestos de estos dos grupos son recalcitrantes debido a su insolubilidad y la presencia de grupos funcionales que los protegen de ataques microbianos por las extensivas estructuras de anillos aromáticos (Eweins, 1999. Pag.30).

2.2.2. Pasivos ambientales

El pasivo ambiental son los daños ambientales, la contaminación del agua, suelo, deterioro de los recursos y ecosistemas, producidos por una empresa en su funcionamiento normal en algunos casos por accidentes imprevistos (Eweins, 1999. Pag.30).

El termino Pasivo Ambiental (PA) es una expresión económica de cuatro capitales: Capital Natural todos aquellos bienes y servicios ambientales y naturales, Capital Humano los individuos y su organización para resolver problemas y Capital Social los grupos sociales que toma decisiones y crea reglas con el fin de cumplir con un objetivo. Los PA afecta al capital natural ya que se deriva de activos ambientales, por eso son las dos caras del mismo negocio petrolero (ECUAMBIENTE CONSULTING Group, 2001. Disponible en: <http://www.ecuambiente.com/>)

Los pasivos ambientales aparecen cuando un activo además de cumplir con su función en la operación empieza a originar un daño o impacto ambiental externo negativo. Los PA se consideran como un costo o daño ambiental que afecta directa o indirectamente a la rentabilidad real y acumulada del sector (PETROECUADOR 1996).



Figura 2 - 2: Pasivos ambientales en la Comunidad Indígena del Ecuador
Fuente: SNMP, 2004.

Los pasivos ambientales del Ecuador se han generado debido a la falta de tecnologías adecuadas cuando inicio con la actividad petrolera (SNMP, 2004), indicados en la tabla Estos residuales comúnmente llamados lodos, se han convertido en un grave problema debido a que las regulaciones ambientales existentes los clasifican como un residuo peligroso, con las correspondientes dificultades en el método de su disposición y tratamiento, generalmente costosos, sin embargo, mediante apropiados sistemas tecnológicos, pueden ser convertidos en materiales de valor energético o pueden ser dispuestos de manera conveniente (Jonson, Jr. et al., 1993).

Tabla 1 – 2: Tipos de Pasivos Ambientales Flujo

Cunetas y alcantarillas azolvadas	TIPOS DE PASIVOS AMBIENTALES
Derrames y liqueos por manejo de combustibles (carga y descarga)	
Descargas de agua de formación del separador API	
Descargas de aguas negras sin tratamiento provenientes de campamentos en funcionamiento	
Efluentes líquidos descargados al ambiente desde las trampas de grasas y aceite	
Fosas con crudo	
Líquidos de tanques de almacenamiento de crudo	
Líquidos de tanques de almacenamiento de diésel	
Líquidos por cubetos con presencia de derrames o Líquidos.	

Líquidos por falta de mantenimiento de equipos	
Mecheros en funcionamiento	
Minas y canteras en uso	
Oleoducto en mal estado y con presencia de Líquidos	
Piscina en uso	
Piscinas en uso con mecheros	
Pozos averiados y con Líquidos	
Sitios utilizados para la disposición de residuos sólidos.	
Suelos contaminados por derrames de crudo	
Suelos contaminados por derrames de diésel	

Fuente: ECUAMBIENTE CONSULTING Group, 1999.
Realizado por: Bastidas Johanna, Cedeño Adriana, 2015.

2.2.2.1. Lodos de fondos de tanque

Estos residuales comúnmente llamados lodos, se han convertido en un grave problema debido a que las regulaciones ambientales existentes los clasifican como un residuo peligroso, con las correspondientes dificultades en el método de su disposición y tratamiento, generalmente costosos, sin embargo, mediante apropiados sistemas tecnológicos, pueden ser convertidos en materiales de valor energético o pueden ser dispuestos de manera conveniente (Jonson, Jr. et al., 1993).

Estos residuos debido su alto grado de contaminación, son dispuestos por las diferentes empresas productoras de los mismos a algunas entidades encargadas de su tratamiento, la mayoría reconocidas como remediadoras ambientales. De acuerdo a la caracterización físico-química de los mismos se puede considerar que poseen índices de contaminación elevados, específicamente con respecto a sus niveles de concentración de TPHs.

2.2.3. Remediación de suelos contaminados con TPHs

El crecimiento de la población y el avance de las actividades industriales a partir del siglo XIX trajeron aparejados serios problemas de contaminación ambiental. Desde entonces, los países

generan más desperdicios, muchos de ellos no biodegradables o que se degradan muy lentamente en la naturaleza, lo que provoca su acumulación en el ambiente sin tener un destino seguro o un tratamiento adecuado. De este modo, en lugares donde no existe control sobre la emisión y el tratamiento de los desechos, es factible encontrar una amplia gama de contaminantes (Balba, et al, 1998, Pag.155-164).

Habitualmente, los casos de contaminación que reciben mayor atención en la prensa son los derrames de petróleo. Pero, en el mundo constantemente están sucediendo acontecimientos de impacto negativo sobre el medio ambiente, incluso en el entorno directo, generados por un gran abanico de agentes contaminantes que son liberados al ambiente. Un ejemplo lo constituyen algunas industrias químicas que producen compuestos cuya estructura química difiere de los compuestos naturales, y que son utilizados como refrigerantes, disolventes, plaguicidas, plásticos y detergentes. El problema principal de estos compuestos es que son resistentes a la biodegradación, por lo cual se acumulan y persisten en el ambiente, perjudicando a los seres vivos, entre ellos al hombre (Balba, et al, 1998, Pag.155-164).

2.2.4. Biorremediación

La biorremediación se define como el uso de procesos de degradación biológica en sistemas naturales para remover o reducir la presencia de contaminantes que amenazan al ser humano o al medio ambiente. (Thapa et al.2012. Pag.14-170).

De este modo, los agentes biológicos pueden secretar enzimas o agentes surfactantes, factores de crecimiento o proteínas que sean de utilidad para otros miembros de una comunidad (Mukherjee & Bordoloi, 2011. Pag 471-478.).

Los organismos más fuertes dentro de la comunidad microbiana son aquellos que transforman el contaminante en compuestos más simples los mismos que pueden ser aprovechados por el resto del grupo (Paliwal, Puranik, & Purohit, 2012), dando lugar de esta manera a procesos de degradación.

Un proceso natural de la remediación es la biodegradación la cual no exige una inversión elevada en reactivos, así como de infraestructura y requerimientos energéticos (Joynt, Bischoff, Turco, Konopka, & Nakatsu, 2006). Aproximadamente se estima que el valor de tratamiento por tonelada de suelo contaminado con hidrocarburos es casi 100% superior cuando se realiza un tratamiento químico en lugar de biorremediación.

Además algunas investigaciones han reportado que el tratamiento de un contaminante in situ es hasta un 40% más económico que el tratamiento ex situ (Maila & Cloete, 2004. Pags. 349-360.).

2.2.4.1. Tipos de biorremediación

Existen varias técnicas en la actualidad de biorremediación que masifican el empleo de microorganismos y/o plantas las que son capaces de degradar así como acumular sustancias contaminantes. Básicamente los procesos de biorremediación son de tres tipos: degradación enzimática, remediación microbiana y fitorremediación.

Para el caso de estudio es de interés el análisis de la remediación microbiana.

2.2.4.1.1. Remediación microbiana

Eweis (1999) hace mención acerca de este proceso de remediación donde se recurre al empleo de microorganismos directamente en el foco de la contaminación; los ya existentes en el suelo son los principales que se usan en la degradación, conocidos como autóctonos o pueden provenir de otros ecosistemas o alóctonos. Proceso que se lleva a cabo mediante la acción natural que efectúan ciertos organismos al transformar algunas moléculas orgánicas en sustancia más pequeñas, con índices de toxicidad menor.

De acuerdo con Argenbio (2004. Pag.6) Los microorganismos toman como fuente de carbono a algunos contaminantes además aprovechan algunos macro-nutrientes como fósforo y nitrógeno. Se dice que la digestión de estos compuestos da origen a sustancias más sencillas de tratar debido a su metabolismo regulador, degradando el contaminante ya sea en forma parcial (Lo transforma) o total mediante el resultado de dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O).

Ewais (1999. Pag.131) “Una vez degradados los contaminantes, la población de microorganismos se reduce porque ha agotado su fuente de alimentos. Las poblaciones pequeñas de microorganismos sin alimentos o los muertos no presentan riesgos de contaminación, ya que se quedan en el suelo y forman parte de la materia orgánica”.

2.2.4.1.2. Bioestimulación

Proceso que consiste en estimular los microorganismos nativos del suelo adicionando nutrientes como nitrógeno o fósforo. Para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos, y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos o a la vez proveer la inmovilización de contaminantes inorgánicos in situ (Van Deuren y col., 1997).

2.2.4.1.3. Bioventeo

Es una forma de estimulación realizada con gases, como por ejemplo oxígeno y metano, estos son adicionados de forma pasiva en el suelo o el material a tratar con la principal finalidad de estimular la actividad microbiana.

El objetivo principal es estimular la biodegradación natural de cualquier compuesto biodegradable en condiciones aerobias, suministrando aire se lo realiza a través de pozos de extracción (extracción o inyección), al terreno para promover la actividad de los microorganismos y biodegradar los hidrocarburos (Ewais 1999. Pag.131).

2.2.4.1.4. Bioaumentación

Representa la inoculación de una alta concentración de microorganismos en el suelo contaminado para facilitar la biodegradación. El principio de la bioaumentación es de utilizar bacterias altamente especializadas para incrementar y mejorar, la capacidad de digestión total de la población bacteria natural, presente en los sistemas de tratamiento de aguas residuales y suelos (Ewais 1999. Pag.131).

2.2.4.1.5. Compostaje

Esta estrategia de biorremediación utiliza microorganismos aeróbicos y termófilos, formando pilas que deben ser mezcladas y humedecidas periódicamente para promover la actividad microbiana. El composteo es un proceso biológico controlado, por el cual pueden tratarse suelos y sedimentos contaminados con compuestos orgánicos biodegradables, para obtener subproductos inocuos estables. El material contaminado se mezcla con agentes de volumen (paja, aserrín, estiércol, desechos agrícolas), que son sustancias orgánicas sólidas biodegradables, adicionadas para mejorar el balance de nutrientes, así como para asegurar una mejor aireación y la generación del calor 38 durante el proceso. Los sistemas de composteo incluyen tambores rotatorios, tanques circulares, recipientes abiertos y biopilas (Alexander 1994, Eweis et al. 1998, Semple et al. 2001).

2.2.4.1.6. Landfarming

El Landfarming es un tratamiento de Biodegradación del EPA para remediación de suelos con hidrocarburos.

A. Sistema de Landfarming

Es un tratamiento in situ o ex situ, este tratamiento utiliza el proceso de biodegradación para la remediación biológica de suelos y lodos contaminados con hidrocarburos. Este tratamiento involucra la remoción del suelo contaminado para posteriormente colocarlo en el lugar donde se llevará a cabo el tratamiento para no contaminar el suelo inferior ni el agua subterránea (EPA, 2009).

Los microorganismos utilizan el contaminante como fuente de alimento por ese motivo crece la actividad microbiana (EPA, 2009).

Llamado tratamiento superficial en tierra, es la técnica de remediación aerobia sugerida para la reducción de la concentración de TPH en suelos contaminados con los mismos, consiste en tratar el suelo previamente excavado en grandes superficies abiertas que posteriormente se voltean y airean. Para evitar la contaminación del suelo primitivo se aísla el material

contaminado, los lixiviados producidos se recogen y se pueden usar para rehumedecer el suelo en tratamiento, de tal manera conservando los nutrientes y bacterias presentes en ellos. (EPA, 2009)

Se utilizan bacterias nativas, para degradar los componentes de petróleo, los mismos degradan el componente orgánico, produciendo dióxido de carbono y agua. Su manejo implica una investigación preliminar del residuo, el control del sitio de degradación, su actividad biológica, el clima, actividad de laboratorio, etc. (EPA, 2009)

La velocidad de degradación depende mucho de la disponibilidad de nutrientes, ausencia de sustancias biotóxicas y de otros parámetros como: salinidad, capacidad de intercambio iónico, potencial de hidrógeno, textura, buena aireación, humedad, drenaje interno y temperatura. (EPA, 2009)

En esta técnica las cepas bacterianas que se aplican al suelo dependen del residuo que se esté tratando. Para el desarrollo eficiente de este proceso es necesario proveer las condiciones óptimas para el crecimiento de la población de microorganismos. (EPA, 2009)

B. Variables que condicionan la biorremediación por Landfarming

El metabolismo de los organismos degradadores de hidrocarburos en los diferentes sistemas o medios tanto terrestres como acuáticos requieren de rigurosas condiciones ambientales la cual le facilite su crecimiento y reproducción. Entre los principales factores a considerar para la ejecución de esta tecnología se consideran los siguientes:

- Suelo
- Biodisponibilidad
- Competitividad
- capacidad metabólica del microorganismo
- Nutrientes
- *pH*
- Temperatura
- Humedad

Suelo

Los contaminantes del petróleo se alojan principalmente en el horizonte A, donde prácticamente se encuentra el mayor contenido de materia orgánica que incluye a los microorganismos. Estos pueden ser estimulados por la adición de nutrientes y controlados por medio de diferentes técnicas de tratamiento (Jorge, 2006. Págs.: 123-215). La textura del suelo y los agentes estructurantes juegan un papel importante en la biorremediación de hidrocarburos. La textura está íntimamente relacionada con la composición mineral, el área superficial específica y el espacio de poros del suelo. Esto afecta prácticamente a todos los factores que influyen en un proceso de biodegradación de hidrocarburos, el cual es aeróbico y requiere de un hábitat con adecuada disponibilidad de agua e hidrocarburo para los microorganismos (Andreas et al, 2010. Págs.: 137-147).

Un estudio comparativo (García et al, 2012, Págs.: 145-152) de Biodegradación de un crudo mediano en suelos de diferente textura con y sin agente estructurante dio como resultado que la biodegradabilidad de hidrocarburo en mayor porcentaje expresada en función de la disminución de los TPHs se obtuvo en un suelo franco arcillo arenoso, demostrando que la disponibilidad y contacto microorganismo hidrocarburo es clave en un proceso de biorremediación, por ello la textura franca y sus variantes pueden resultar mejor para la aplicación de esta técnica.

Los contaminantes del petróleo se alojan principalmente en el horizonte A, donde prácticamente se encuentra el mayor contenido de materia orgánica que incluye a los microorganismos. Estos pueden ser estimulados por la adición de nutrientes y controlados por medio de diferentes técnicas de tratamiento (Jorge, 2006. Págs.: 123-215).

Influencia del estiércol

El estiércol es un material que tiene la capacidad de aumentar la microflora dentro de un tratamiento de remediación, además que es un buen agente de volumen.

Por medio de sus deyecciones líquidas y sólidas del ganado, estas han sido utilizadas como abono desde el inicio de la agricultura prácticamente, posee alta capacidad ya que no solo proporcionan nutrientes al suelo sino que aportan materia orgánica y favorecen la presencia de microorganismos responsables de la fertilidad de la tierra, mejorando consigo la tasa de degradación de contaminantes.

Biodisponibilidad

Estudio de factores limitantes como la capacidad de adsorción por parte de la fase sólida así como su porosidad, la alta tortuosidad del sistema, la fase no acuosa del suelo. Todos estos aspectos condicionan el medio para que los hidrocarburos o al agente contaminante sea relevante en la actividad de los microorganismos (Johnsen et al., 2005).

Competitividad

Consiste en el desigual comportamiento de dos o más organismos frente a un mismo requerimiento, siempre y cuando su empleo reduzca la cantidad disponible para los demás. Una de las competencias más comunes se da por nutrientes, oxígeno o espacio (UMMS, 2000).

Capacidad metabólica del microorganismo

Conocidos como consorcios microbianos son aquellos que las *Pseudomonas* o el microorganismo a emplear en el proceso de biorremediación forman al interactuar con las poblaciones nativas del medio. Por medio de todas estas interrelaciones se ha logrado estimar que la cantidad de microorganismos mínimos para efectuar un proceso de biorremediación tomando en cuenta las condiciones ambientales adecuadas es de 10^3 a 10^4 UFC/g suelo y de heterótrofos totales de 10^5 a 10^6 UFC/g de suelo (Ercolie, 2015).

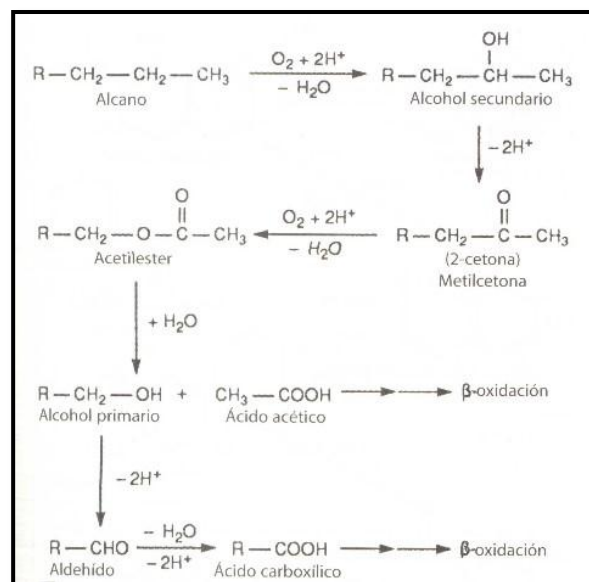


Figura 3 - 2: Degradación de hidrocarburos alifáticos en presencia de oxígeno

Fuente: SNMP, 2004

Nutrientes

Estas sustancias que al ser de origen químicos son indispensables para producir actividad microbiana y metabólica de las *Pseudomonas*, asimilables para provocar síntesis, controlados rigurosamente para aumentar la eficiencia y el buen desarrollo de la degradación del contaminante (Viñas, 2005. Págs.: 45-87).

Cuando se presenta como factor limitante es necesario incorporar fertilizantes de uso agrícola tal es el caso de urea o sulfato de amonio y de origen orgánico como estiércol, para acelerar el proceso de degradación (Jorge, 2006. Págs: 123-215).

Se dividen en dos grandes grupos: macronutrientes y micronutrientes.

Los macronutrientes de mayor importancia de carácter metabólica tenemos al carbono (C) en este caso los hidrocarburos debido a que como contaminantes proporcionan la energía necesaria en la fabricación de compuestos celulares y otros productos metabólicos como es el caso de dióxido de carbono, agua, enzimas; el Nitrógeno (N), indispensable para la formación de aminoácidos, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares (Pardo, 2004. Págs.:40-49).

El fósforo (P) proporciona energía dentro del metabolismo intrínseco de las células, requerido para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos. Adicionado al suelo como fosfato diamónico o fosfato tricálcico. El Potasio (K) requerido por una gran cantidad de enzimas para catalizar diferentes reacciones (Pardo, 2004. Págs.:40-49).

En general suele haber en el suelo concentraciones de macronutrientes suficientemente rentables, pero si estos no se encuentran en rangos normales se puede recurrir a dispersar raciones extras en el medio. Por ejemplo; si la concentración de nutrientes inorgánicos como es el caso del N y P es baja, conlleva a producir una relación C/N y C/P muy altas, lo que perjudica el crecimiento microbiano, aclarando este detalle se menciona que un rango normal es aquel que oscila a la relación C: N: P dentro de un rango normal de 100:10:1 a 100:2:0,2. (Krieg et al, 1984. Págs.:141-149).

Entre los oligoelementos o elementos minoritarios tenemos al hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn), azufre (S), cobalto (Co), manganeso (Mn), magnesio (Mg) y calcio (Ca), y debido a que el suelo contiene una gran cantidad de estos micronutrientes en su propio estado natural, normalmente no se adicionan en el proceso de biorremediación (Jorge, 2006. Págs.: 123-215).

El pH

Influye directamente en la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos, ya que puede intervenir en el desenvolvimiento degradativo en los microorganismos en especial al de las *Pseudomonas* y la biodisponibilidad de las fuentes de carbono y energía. Las *Pseudomonas* se pueden adaptar fácilmente a condiciones extremas (Hambrick et al, 1980. Págs.: 365-369).

A pH extremadamente alcalinos o extremadamente ácidos la biodegradación se hace lenta. Los suelos contaminados por hidrocarburos tienden a presentar características ácidas, por ello el crecimiento y la actividad de las *Pseudomonas* es limitada. El rango óptimo para la biodegradación está entre 6–8 pH. (Alexander, 1994. Págs.: 420-475). En general, el pH óptimo para el crecimiento de las bacterias heterótrofas es neutro (pH 6-8), mientras que es más ácido para los hongos (pH 4-5).

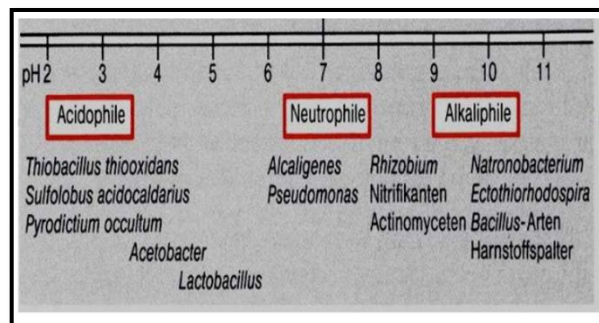


Figura 4 - 2: Supervivencia de algunos microorganismos en diferentes condiciones de pH.

Fuente : (Bodishbaugh, 2006)

Temperatura

Los procesos de degradación de contaminantes dentro de la biorremediación se llevan a cabo entre temperaturas que oscilan los 20° C y 40° C. Esta temperatura es óptimo para la actividad microbiana, aunque en climas tropicales se recomienda una temperatura aproximadamente de 30 a 35° C para la actividad de las *Pseudomonas* especialmente (Dibble, 1979. Págs.: 729-739). Cuando se ha superado los 40°C se tiende a producir una disminución de la actividad microbiana, así como una rotación poblacional que se dirigen a especies más resistentes a las altas temperaturas o al mismo tiempo se puede disminuir o decrecer la biorremediación. Si la temperatura se aproxima a 0°C se detiene esencialmente la biodegradación. Las *Pseudomonas* tienden a sufrir transformaciones estructurales frente a los cambios bruscos de humedad y temperatura, adquiriéndole la ventaja ya que le que permiten su adaptación al medio (Jorge, 2006. Págs. 123-215).

Tabla 2 – 2: Temperaturas en °C para el crecimiento de algunas especies

Rangos de Temperatura para crecimiento			
Especie	Límite mínimo	Límite óptimo	Límite máximo
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	30-37	45
<i>Pseudomona sp</i>	4	35	41
<i>Escherichia coli</i>	10	37	45
<i>Clostridium Kluyveri</i>	19	35	37
<i>Bacillus flavothermus</i>	30	60	72
<i>Thermus aquaticus</i>	40	70-72	79
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	70	75-85	90
<i>Pyrobacterium brockü</i>	80	102-105	115

Fuente Madigan, Martinko & Parker, 2003.

Realizado por: Bastidas Johanna, Cedeño Adriana, 2015.

Humedad

Las *Pseudomonas* requieren unas condiciones mínimas de humedad para su crecimiento y desarrollo; el agua es importante para su desarrollo porque esta interviene directamente como medio de transporte de nutrientes y de oxígeno a la célula ; esto se produce debido a que el líquido vital forma parte de su protoplasma bacteriano (Jorge, 2006. Págs.: 123-215).

Recomendable mantener una humedad del orden del 25 - 75 %. (Haigler et al, 1992. Págs.: 2237–2244). Cuando la saturación de agua en el suelo se encuentra entre el 30% a 90% se dan las mejores tasas óptimas de biodegradación. En valores menores la degradación se ve inhibida (Zhongqi & Sppain, 1997. Págs.: 4839–4843).

Relación humedad / temperatura

La humedad y la temperatura se deben tener en cuenta en el momento de la aplicación de la técnica de biorremediación, tomando en cuenta que a partir de estos dos parámetros se puede evaluar también la eficacia del procedimiento (Atlas, 1981. Págs.: 180–209).

Las *Pseudomonas* tienen la capacidad de responder a cambios ambientales mediante la modificación de su composición de ácidos grasos de la membrana celular, con ello logra mantener la homeoviscosidad de la misma frente a situaciones de estrés, adaptándose posteriormente. Las *Pseudomonas* son microorganismos euritéricos, que son microorganismos con la capacidad de adaptarse a los cambios (Pucci et al, 2004. Págs.: 6-15).

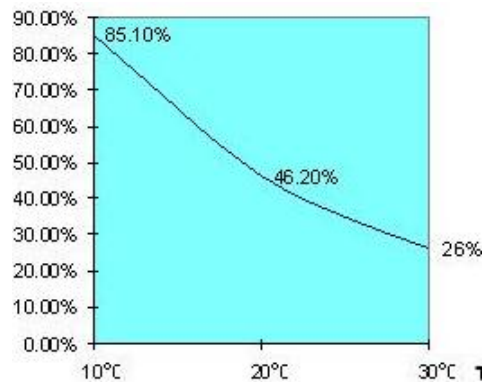


Figura 5 - 2: Relación humedad/temperatura

Fuente: Pucci et al, 2004.

La humedad disminuye con el aumento de temperatura. La humedad es inversamente proporcional. En este caso las *Pseudomonas* necesitan una humedad entre el 25-75% para llegar a ese porcentaje la temperatura debería estar entre 15 a 30 °C.

2.2.5. Importancia de los microorganismos en la degradación de TPHs

2.2.5.1. Microorganismos degradadores de Hidrocarburos en Pasivos Ambientales


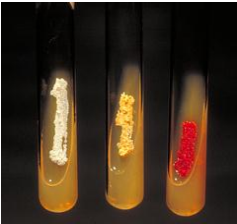

Los microorganismos se adaptan o desarrollan y se estima que en un gramo de suelo en buen estado se desarrolla y prolifera la vida, se puede encontrar hasta 600 millones de bacterias las cuales se pueden clasificar entre 15 mil y 20 mil especies distintas (Ogram, 1997)


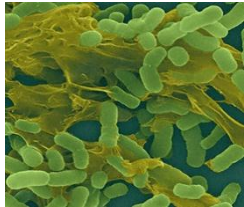

Tabla 3 - 2: Composición estimada de bacterias de suelo en buen estado.

ESPECIES	BACTERIAS EN EL SUELO (%)
<i>Arthrobacter</i>	5-60
<i>Bacillus</i>	5-67
<i>Pseudomonas</i>	3-15
<i>Agrobacterium</i>	1-20
<i>Flavobacterium</i>	1-20
<i>Alcalígenes</i>	1-20
<i>Corynebacterium</i>	2-12
<i>Micrococcus</i>	2-10
<i>Taphylococcus</i>	<5
<i>Xanthomonas</i>	<5
<i>Mycobacterium</i>	<5

Fuente de consulta: Organismos degradadores de hidrocarburo (Ron, 2009) Págs. 209-230.

Tabla 4 – 2: Microorganismos reportados como degradadores de Petróleo tanto en sistemas acuáticos como terrestres

Especie de bacteria	Morfología y Caracterización	Aplicación en Campos de Remediación Petrolera y Derivados	Imagen
<i>Rhodococcus</i>	Aeróbicos Gram positivos con carácter móvil, con caracterización bioquímica de producción de poli-3hidroxialcanoatos, con la capacidad de acumulación de metales pesados y algunas enzimas útiles como la fenilalanina, deshidrogenasa y endoglucosidasas.	Excelente candidato para la remediación de compuestos aromáticos, algunas de sus aplicaciones está la utilización del dibenzotiofeno (DBT) como única fuente de azufre, el DBT y sus derivados son los órganoazufrados más abundantes en el diésel primario.	
<i>Gordona</i> y <i>Nocardia sp.</i>	Es un género de bacterias Gram-positivas que se encuentran en suelos de todo el mundo ricos en materia orgánica.	Producción de Ácido acrílico y acrilamida, conversión de esteroides, biorremediación de hidrocarburos clorados y fenoles, a lo que se añade su gran capacidad de degradar hidrocarburos alifáticos halogenados y numerosos compuestos aromáticos, como los HAPs (hidrocarburos policíclicos aromáticos)	
<i>Pseudomonas</i>	Las Pseudomonas son bacterias Gram negativas, obicuas, que pertenecen a la subclase gamma de las Proteobacterias, con la habilidad de emplear en su metabolismo diversos sustratos, incluyendo los del petróleo. Al ser productoras de biosurfactantes como es el caso de los ramnolípidos están directamente involucrados en procesos de remoción de aceites y productos relacionados.	Degradadora de gran cantidad de sustratos como el n-hexadecano y degradadora de hidrocarburos aromáticos y poliaromáticos, así como del pireno en estudios invitro. <i>P. aeruginosa</i> responsable de mineralización de compuestos alifáticos en condiciones anaerobias. <i>P.putida</i> degradación de los TPH (Hidrocarburos Totales). La <i>Pseudomonas fluorescens</i> es degradadora de naftaleno y fenantreno	
Continuación Tabla 4-2.			

<p><i>Burkholderia</i></p>	<p>Bacilo Gram negativo no fermentador, productora de pigmento amarillo, responsable de una gran capacidad mutagénica y adaptativa, a partir de aguas superficiales fue recuperado y estudiado en medios húmedos, es resistente a múltiples antibióticos y esta capacidad es altamente transmisible entre especies.</p>	<p>Empleada en la biorremediación de herbicidas y pesticidas recalcitrantes .Posee un alto poder preventivo de alteración a invasión de hongos. Excelente degradadora de los hidrocarburos aromáticos</p>	
<p><i>Acinetobacter sp</i></p>	<p>Bacilo Gram negativo, es productor de una sustancia con carácter ácido a partir de la glucosa, alcanza su desarrollo en una media de 41 y 44°C, produce axilosa y utiliza el malato.</p>	<p>Eficientes en la degradación de fracciones de alcanos. La degradación de gasolina en sitios contaminados, alcanzando eficiencias de degradación de hasta el 90 %.</p>	
<p><i>Sphingomonas</i></p>	<p>Bacilos no fermentadores- es un grupo de bacterias Gram negativas con forma de bacilo, quimioheterótrofas y estrictamente aerobias, posee capacidades biodegradantes y biosintéticas.</p>	<p>Alta capacidad degradativa en condiciones anaerobias sobre el 2,7-diclorobenceno, produciendo el metabolito 4-clorocatenol y el 1,2,3,4-tetraclorodibenceno. Además de poseer capacidad metabolizante de naftaleno y fenantreno al sintetizarlo como su fuente de carbono</p>	

Fuente Organismos degradadores de hidrocarburo (Ron, 2009) Págs. 209-230.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A. 2016.

Tabla 5 - 2: Otros organismos degradadores.

Otras bacterias:		Algunos Hongos	
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Actynomicetes</i> • <i>Alcalígenes</i> • <i>Bacillus</i> • <i>Flavobacterium</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lactobacillus</i> • <i>Spirillum</i> • <i>Vibrio</i> • <i>Entre otras</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Aspergillus</i> • <i>Candida</i> • <i>Penicillius</i> • <i>Saccharomyces</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Phialophora</i> • <i>Fusarium</i> • <i>Spirillum</i> • <i>Entre otros</i>
<p>Además se han reportado algunas investigaciones donde se asegura que algunas especies de camarones también pueden actuar como organismos degradadores de petróleo, especies como el <i>Panaeus duorarum</i> y <i>Panaeus aztecus</i>.</p>			

Fuente Organismos degradadores de hidrocarburo (Ron, 2009) Págs. 209-230.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A. 2016.

2.2.6. *Pseudomonas*

Con respecto al estudio de esta bacteria podemos recalcar a Schroeter (1872) quien le dio nombre de *Bacterium aeruginosum*, Luego de numerosos estudios de morfología y dinámica en 1894 el botánico alemán Wallter Migula define a un nuevo género que lo denominó como *Pseudomonas*.

Teóricamente el nombre Pseudomona proviene de una etimología griega:

Pseudo = Falso

Monas = Unidad

Reconocida por su gran versatilidad metabólica y plasticidad genética, por lo general crecen rápidamente con habilidad de degradar una serie de sustratos, como compuestos tóxicos, incluyendo hidrocarburos aromáticos y alifáticos. Presentan alta resistencia a antibióticos, desinfectantes, detergentes, metales pesados y algunos solventes orgánicos.

Estudios nos revelan que los n-alcenos son los compuestos que forman el petróleo en mayor abundancia, los mismos que son biodegradables mediante métodos aeróbicos por diferentes rutas. Por ejemplo, la *Pseudomona putida* posee la capacidad de degradar las estructuras de los n-alcenos a partir del alceno hidroxilasa.

El plásmido de las *Pseudomonas* posee la característica de degradar en etapas sucesivas al anillo aromático en benzoato, alcohol bencílico y catecol (Harayama et al, 1999, Págs -63-70).

2.2.6.1. Taxonomía bacteriana

Filo: *Proteobacteria*

Clase: *Gammaproteobacteria*

Orden: *Pseudomonadales*

Familia: *Pseudomonadaceae*

Género: *Pseudomonas*

2.2.6.2. Características morfológicas

Bacilo Gram negativo aerobio, sin capacidad de formar esporas con una dimensión de 1.5 a 5 µm de largo y un diámetro de entre 0.5 a 1.0 µm. Son de carácter móvil, debido a la presencia de uno o más flagelos polares. Esta movilidad les ayuda a responder a estímulos químicos conocido este proceso como quimiotaxis. (Palleroni, 2005. Págs. 323-379).

2.2.6.3. Rangos de tolerancia

Al ser oxidasa y catalasa positiva es una especie que no crecen en condiciones ácidas, es decir un pH menor a 6 Como no fermentadores de lactosa tienen facilidad de desarrollarse en agar MacConkey. (Palleroni, 2005. Pp. 323-379).

Temperatura óptima de crecimiento entre 30 y 35 °C, aunque son capaces de desarrollarse en ambientes extremos como los de alta salinidad llegando a rangos de supervivencia entre 20 y 42 °C (Meyer, 2002. Págs. 2745-2753).

2.2.6.4. *Parámetros de crecimiento*

Ambientes acuáticos y terrestres, presentándose también en tejidos animales y en plantas, incluyendo además verduras y frutas. Una temperatura entre un rango desde 4 a 40 °C y un *pH* comprendido entre 6 y 8 ya sea que contenga compuestos de carácter orgánico simple o complejos en ambientes húmedos o secos, en condiciones aeróbicas, mesófilas. Para su desarrollo y colonización el único requerimiento estricto es la presencia del Oxígeno (Meyer, 2002. Págs. 2745-2753).

Su cultivo bacteriano se da en caldos o agares, tales como:

- Medio de cultivo base agar con Soya-Tripcaseína
- Caldo Nutritivo
- Agar Cetrimida
- Medio de cultivo base agar con sangre
- Agar Mueller Hinton
- Caldo Casoy, entre otros.



Figura 6 - 2: Colonias de *Pseudomonas* sobre agar sangre.
Fuente: Judy, 2009.

2.2.6.5. *Reputación y desacreditación de las Pseudomonas*

Palleroni (1993) pone a disposición su exhaustiva investigación acerca del protagonismo de las *Pseudomonas*, la capacidad de desintoxicar ambientes altamente dañados por la contaminación

en diferentes dimensiones y magnitudes; tanto naturales como antropogénicas. Gran cantidad de estos compuestos orgánicos son descompuestos por estas bacterias que desempeñan un papel brillante en el escenario de las afectaciones medio ambientales.

En bioquímica, genética, ecológica y biotecnología se emplea una gran cantidad de compuestos de diferentes orígenes como sustratos o simplemente intermediarios de una reacción catalítica, incluyendo además compuestos más difíciles de degradar como es el caso de los aromáticos y una gran variedad de residuos orgánicos recalcitrantes. (Pelleroni, 1993. Págs. 231-251).

Las *Pseudomonas*, algunas especies tienen gran importancia fitopatogénica, así como algunos géneros presentan toxicidad en humanos y animales. Los plásmidos que poseen estas bacterias son transcendentamente catabólicos, relacionados a genes que son capaces de codificar varias enzimas con alto poder degradatorio, estos plásmidos pueden ser fácilmente transmitidos a otras bacterias Gram negativas por medio de conjugación, representando así un valioso depósito de material genético, que al mismo tiempo puede ser compartido por varias entidades orgánicas (organismos) filogenéticamente distantes, por lo que se presenta la mayor inconveniencia en el rol que desempeñan estas bacterias al convertirse en factores fuertemente resistentes selectivamente a antibióticos, agentes antibacterianos y hasta perjudicar a sistemas de degradación de compuestos (Pelleroni, 1993. Págs. 231-251)

Al participar activamente en el ciclo de carbono en la naturaleza, las *Pseudomonas* son consideradas uno de los organismos aeróbicos con mayor versatilidad en cuanto a la degradación de compuestos orgánicos con bajo peso molecular. (Pelleroni, 1993. Págs. 231-251)

2.2.7. *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona putida*

2.2.7.1. *Pseudomona aeruginosa*

En el año de 1872 Schroeter aisló ambientalmente la *Pseudomona aeruginosa*, demostrando que las colonias de esta bacteria producen pigmentos azul-verdoso, por eso el origen de su nombre que proviene de la etimología “*aeruginous* “que significa “*el color del cobre oxidado*”. (Schroeter, 1872). Una de sus características más versátiles es que es una oxidasa positiva pudiendo sobrevivir en ambientes de temperaturas mayores a 42 ° C. Empleando alrededor de

más de 80 compuestos orgánicos como principales fuentes de carbono y de energía (Ruíz, 2007. Págs. 22-62).

Relativamente existe algunas contradicciones, se menciona que todos los seres humanos estamos en contacto diariamente con *P. aeruginosa*, debido a que se encuentra en pequeñas cantidades de concentraciones en ciertos alimentos que consumimos así como en ciertos artículos de limpieza. De hecho, estudios de aislamiento de esta bacteria se han obtenido a partir de entre el 2 y el 8% de las heces de personas sanas, lo que significa que cotidianamente tenemos contacto con esta bacteria y sólo representa una amenaza potencial para nuestra salud en condiciones sumamente especiales (Bellido, 1992. Págs. 5196-5206).

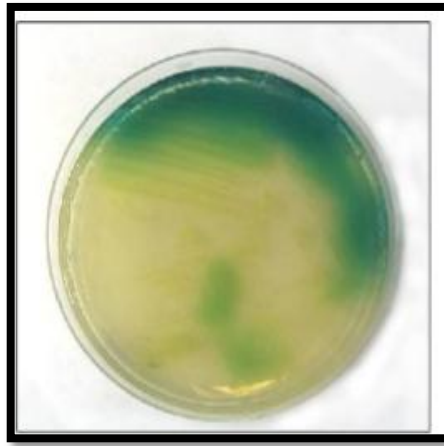


Figura 7 - 2: *Pseudomonas aeruginosa* en Agar Cetrinide

Fuente: Fuenmayor & Rodríguez, 1992.

De acuerdo a su impresionante morfología se dice que la especie *Pseudomonas aeruginosa*, se encuentra entre las de mayor resistencia a ambientes agresivos, adversos y cambiantes con capacidad nutricional para mineralizar gran variedad de hidrocarburos del petróleo. Posee capacidad degradadora de compuestos alifáticos así como aromáticos y poliaromáticos en condiciones aerobias, microaerófilas y desnitrificantes (Bellido, 1992. Págs. 5196-5206). Entre todas las aplicaciones ambientales de la *P. aeruginosa* también poseen una gran problemática:

Infecciones causadas por *Pseudomona aeruginosa*

No cabe duda que la capacidad remediadora de esta bacteria es sorprendente, pero al mismo tiempo es causante de una infinidad de problemas con carácter virulento, debido a que su patogenicidad es bastante elevada (Morrison, 1984. Págs. 627-642).

Entre las principales infecciones que pueden producir tomando en cuenta las características del huésped (pacientes inmunocomprometidos y en estado de nosocomios) son: Principalmente se presenta mediante queratitis (infección en la córnea), un paciente hospitalario corre mayor riesgo de contraer pulmonía al recibir respiración artificial por medio de tubos, infección del sistema urinario a través de intervenciones quirúrgicas e infección en quemaduras debido a que la piel ha sufrido daños aumentando su susceptibilidad al ser más permeable a agentes externos. (Morrison, 1984. Págs. 627-642).

2.2.7.2. *Pseudomona putida*

Es una de los géneros de *Pseudomona* más importantes tanto a nivel ecológico, industrial, genético y biotecnológico. Excelente candidato para el tratamiento de compuestos aromáticos y xenobióticos, a más de estar capacitada para la colonización del sistema radicular de los vegetales, debido a su fácil manipulación genética al formar biopelículas fácilmente (Molina, 2014. Págs.: 425-460).

La mutación resultante es responsable de codificar una ruta de degradación de tolueno y xilenos, que según muchos expertos la califican como una de las mejores caracterizadas con respecto a índices de genética y bioquímica (Braibant, 2004. Págs. 18-25).

Por ello la *Pseudomona putida* es considerada como un saprofito del suelo, con carácter oportunista, metabólicamente versátil, ya que el ser administradora de una dioxigenasa inicial, que pese a que no es específica para HAPs es una potencial candidata para la aplicación de servicios biotecnológicos tanto en biorremediación como en la agricultura (Lepo, 2001. Disponible en: <http://www.kmprc.or.kr/dataroom/2001iosc/PDF/00609.pdf>. 33).

Su amplitud de *P. putida* se debe en base a su capacidad para aliviar un factor conocido como el estrés oxidativo que puede ser endógeno como exógeno. El primer estrés oxidativo endógeno es

producido a través de un metabolismo aeróbico, en cambio el estrés oxidativo exógeno es producido por factores que se forman inevitablemente como una consecuencia de la interacción con los diversos agentes ROS (especies reactivas de oxígeno, que no son más que un conjunto de moléculas reactivas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno, así como se pueden presentar otros casos con los radicales libres y los peróxidos. Su gran reactividad se debe a que poseen electrones desapareados que les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de óxido-reducción.) Inductores presentes en diferentes nichos. (Holden, 1997: Págs. 143 a 51)

La ubicuidad de la especie *Pseudomonas putida* refleja su capacidad arrolladora como producto de desarrollo para adaptarse a ambientes alterados o no, atribuyéndolo características físico-químicas exquisitas, adecuando un sistema de control génico que le facilite la regulación del metabolismo celular (Holden, 1997: Págs. 143 a 51).

Hábitat

La bacteria como tal podría considerarse en el grupo de las ubicuas, pero no es así, pese a sus múltiples lugares en los que se puede encontrar. Su hábitat está generalmente en el suelo y zonas acuosas, en pacientes hospitalarios no es muy frecuente encontrarla, a excepciones de unos en donde se le atribuyen infecciones provocadas por el mal uso de catéteres o agujas (García, 2000. Págs. 26-37).

Siendo el oxígeno molecular (O₂) su más exigente requerimiento para su desarrollo. Son mesófilas con un crecimiento óptimo en un rango de temperatura entre 30-35°C y con un pH de 6 – 8.

Una desventaja es aquella en donde este género no posee la capacidad de romper ciertos componentes como son Teflón, espuma de poliestireno, además de aquellos productos orgánicos que contienen un solo hidrógeno (Palleroni, 1992. Págs: 240-250). A lo largo de la historia se ha proclamado una disputa acerca de este tema, porque se dice que la temperatura de crecimiento superior de *P. putida* es de 35 grados centígrados. Entonces se puede concluir que la cepa no puede vivir dentro del cuerpo humano (37°). Además se dice que pese a diversas investigaciones jamás han encontrado un caso en *P. putida* causado una enfermedad en las planta. (Palleroni, 1992. Págs: 240-250).

2.2.8. Masificación

2.2.8.1. Masificación de consorcios microbianos

Proceso que tiende a seguir un protocolo riguroso en el que comprende:

- a) Preparación de un pre-inóculo, reactivando el consorcio de interés en un medio mineral.
- b) Incubar en condiciones adecuadas, a través de la intervención de la agitación previamente determinado en una respectiva curva de crecimiento.
- c) El siguiente paso consiste en preparar el medio de cultivo para la producción, se recomienda conocer el la cinética de crecimiento del microorganismo a emplear, ya que esta concentración es más importante que el volumen del cultivo incluso.
- d) Masificar el pre-inoculo en un fermentador biológico, bajo condiciones pre-establecidas para cada consorcio. (PETROECUADOR, 2005. Pág. 34-35).

2.2.9. Marco Legal

2.2.9.1. Reglamento de Operaciones Hidrocarburíferas del Ecuador (RAOHE)

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

Los límites permisibles a aplicarse en un proyecto determinado dependen del uso posterior a darse al suelo remediado, el cual constará en el respectivo Programa o Proyecto de Remediación aprobado por la Subsecretaría de Protección Ambiental. De presentar los suelos naturales (no contaminados) del área concentraciones superiores a los límites establecidos, se pueden incrementar los valores del respectivo parámetro hasta este nivel, siempre que se haya comprobado este fenómeno estadísticamente a través de un monitoreo de suelos no perturbados ni influenciados en el mismo área. El monitoreo consistirá de una caracterización inicial del sitio y/o material a remediarse, un monitoreo de por lo menos un muestreo con los respectivos análisis cada seis meses, y una caracterización final una vez concluidos los trabajos.

Dependiendo de la tecnología de remediación aplicada, la frecuencia del monitoreo será mayor, conforme al Programa o Proyecto de Remediación aprobado por la Subsecretaría de Protección Ambiental.

Parámetro	Expresado en	Unidad 1)	Uso agrícola 2)	Uso industrial 3)	Ecosistemas sensibles 4)
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

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 (construcciones, 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 Ambiente.

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1. Marco Metodológico:

3.1.1. Ubicación:

- Coordenadas del laboratorio AQLAB: 18M 0279263 9948509 UTM
- Coordenadas del invernadero: 18M 02279282 9948508 UTM

Se realizó la construcción del invernadero con la finalidad de acelerar el proceso de deshidratación de los pasivos ambientales, los cuales se obtuvieron de la mezcla de suelo contaminado con hidrocarburo y lodos de fondo de tanque. Con una base previamente impermeabilizada con geomembrana de polietileno, cuya intención es evitar percolación durante todo el proceso, se incorporó aserrín como material de préstamo. Posterior a la respectiva deshidratación se realizó la comparación de eficiencia en 12 cajas experimentales de madera con dimensiones de 20 cm de ancho por 20 cm de largo y 20 cm de profundidad, las mismas que estaban codificadas con 1 y 2 para aquellas que no contenían adición de batería, conocidas como blancos, las 10 restantes divididas en dos secciones; los códigos 1a, 1b, 1c, 1d y 1e correspondiente a la *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442^{TM*} mientras que 2a, 2b, 2c, 2d, y 2e a *Pseudomonas putida* ATCC 31483^{TM*}, activamos la cepas con el método uno (Ver anexo: E4) y colocamos en las cajas con suelo según correspondían los códigos. Las cepas fueron adquiridas en consorcios puros a través de MEDIBAC INC S.A. Proveedor integral para Laboratorio.

Empleando agua de peptona como medio enriquecido se masificó las bacterias adaptándolas previamente en botellas ámbar de 500 mL, adicionando una porción pertinente de petróleo crudo para adaptar a la cepa en manipulación. Se incorporó a las cajas experimentales volúmenes de 10, 20, 30, 40 y 50 mL respectivamente. Se realizó la comparación de eficiencia de las bacterias por medio del análisis de TPHs en los siguientes tiempos de tratamiento:

14/09/2015, 09/10/2015, 28/10/2015, 12/11/2015 y el 04/12/2015. También controlábamos otros parámetros como pH, Temperatura y Humedad tres veces por semana el mismo día realizábamos homogenización (volteo) e irrigación (humedecer).

Después de analizar los resultados procedimos a escoger la bacteria con mayor porcentaje de eficiencia, la masificamos y le adicionamos al suelo patrón, estimulando el suelo con la técnica de Landfarming, este se aireaba y volteaba 3 veces por semana, añadiendo también materia orgánica, Nitrógeno, Fósforo, Potasio y estiércol en cantidades requeridas. Finalmente se realizaron los análisis respectivos con control constante de las variables.

3.1.2. Descripción del sitio de trabajo:



Figura 1 - 3: Ubicación del AqLab
Fuente: Google Earth

La Biorremediación de pasivos ambientales se realizó en el Laboratorio AqLab ubicado en la Provincia de Orellana en la ciudad del Coca. Lugar de ubicación 18M 279253.27m E 9948504.22m S elación 257m.

3.1.3. Tipo y Diseño de Investigación:

Aplicado a biorremediación de suelos contaminados con TPHs. Tipo Prospectivo, laboratorio y bibliográfico.

Diseño Cuasi-experimental

3.1.4. Unidad de Análisis

- Las *Pseudomona putida* y *Pseudomona aeruginosa*

3.1.5. Población de Estudio

- 12 muestras de 2 kg de suelo
- 640 kg de suelo de estudio (muestra patrón) donde se aplica Landfarming.

3.1.6. Tamaño de Muestra

- Doce muestras en las cajas experimentales
- 640 kg de suelo de estudio

3.1.7. Selección de muestra

- La muestra de suelo fue tomada aplicando el método de cuarteo, con la ayuda del barreno.
- Las cepas de *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona putida* fueron adquiridas como cepas puras del laboratorio MEDIBAC INC S.A. Proveedor integral para Laboratorio.

3.1.8. Técnicas de Recolección de Datos

a. Observación directa de los hechos.

b. Análisis de laboratorio:

Se realizó seguimiento del proceso mediante análisis químico-físicos y microbiológicos con la asistencia del laboratorio AqLab.

3.2. Parte Experimental

3.2.1. Caracterización físico-química y microbiológica:

En la investigación se efectuaron tres momentos de análisis físico químicos y microbiológicos; análisis iniciales del proceso para conocer los valores de las variables objeto de estudio y que sirvieron como punto de partida de este trabajo. Análisis intermedios que sirvieron para realizar el control de crecimiento de las bacterias y los análisis finales para la comprobación de eficiencia del proceso.

Parámetros de control:

Realizaremos análisis cuando era necesario para evitar inconvenientes y para saber el grado de degradación de hidrocarburo de las bacterias para conocer cuál es la más eficiente.

Los parámetros medidos:

- pH.
- Temperatura.
- Humedad.
- Población bacteriana.
- Hidrocarburos Totales del Petróleo

3.2.2. Comparación de eficiencia de degradación de TPHs:

3.2.2.1. Construcción del Invernadero

Con la finalidad de deshidratar los pasivos ambientales (residuos de fondos de taque y suelo contaminados con hidrocarburos) y mantener los parámetros adecuados.

Los materiales ocupados fueron geomembrana, plástico de invernadero, madera, clavos, martillo, motosierra y pala.

Se adecuó del lugar sacando la maleza y basura, posteriormente se realizaron orificios para colocar vigas de dimensiones de 10cm de ancho x 10cm de espesor y 2,5m de largo.

Se colocó una geomembrana en la base del suelo con una inclinación de 30°, cubriendo las vigas con plástico propiamente para invernadero.

Las medidas del invernadero fueron: 2m de ancho x 3m de espesor y 2m de altura.

3.2.2.2. Transporte de muestras al invernadero:

Los pasivos ambientales entregados por el laboratorio AqLab fueron transportadas al invernadero para comenzar con su deshidratación, homogenización y para que de estas se escoja una muestra representativa (muestra madre), y a partir de ella se tomen doce muestras que colocadas en cajas de madera y conteniendo 2000g de suelo cada una, sirvieran en la investigación de eficiencia con la inoculación de las bacterias *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona putida*.



Gráfico 1 - 3: 6 cajas con *Pseudomona aeruginosa* siguientes códigos 1, 1a, 1, 1c, 1d, y 1e.

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

3.2.2.3. Codificación de las muestras:

De las 12 cajas previamente seleccionadas, 2 de ellas fueron codificadas como 1 y 2 respectivamente y se las denominó blancos pues a estas no se inocularon bacterias.

De las 10 muestras restantes, cinco fueron inoculadas con *Pseudomona aeruginosa* y cinco para *Pseudomona putida*, tal y como se muestra a continuación:

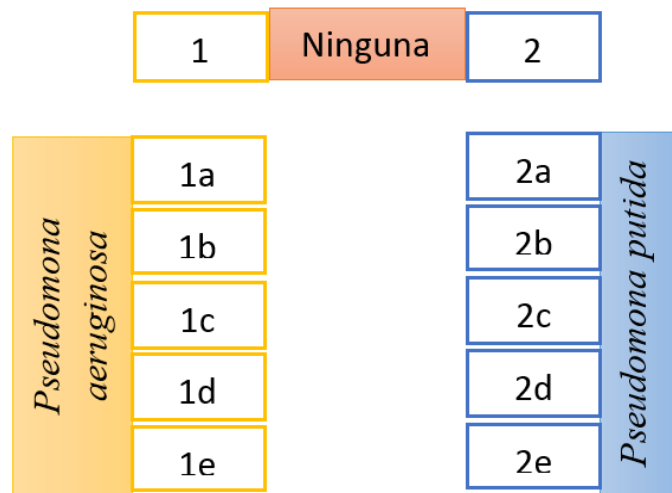


Gráfico 1 -3: Codificación de cajas experimentales
Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

3.2.2.4. Activación de cepas

Se colocó en las cajas experimentales un inóculo puro de *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona putida* respectivamente según la codificación proporcionada para la comparación de eficiencia de degradación de TPHs, para lo cual se adquirieron 2 kiwt stik de cepas puras de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 15442^{TM*} y *Pseudomona putida* ATCC 31483^{TM*}. Se activa la cepa con el método 1 como lo dice el manual que MEDIBAC Proveedor Integral para Laboratorio envía junto al certificado de cada bacteria. (Ver anexo: E4)

3.2.2.5. Selección de la *Pseudomona* más eficiente:

Se seleccionó la *Pseudomona* más eficiente después de haber realizado una comparación numérica de resultados obtenidos del análisis de porcentaje de degradación de TPHs en cada caja experimental durante las siguientes fechas.

Tabla 1 - 3: Fechas de análisis

FECHA	NÚMERO DE MUESTRAS	TIEMPO DE SECADO	OTROS PROCESOS
14/09/2015	12	2 a 3 días.	Tamizado
09/10/2015			
28/10/2015			
12/11/2015			
03/12/2015			

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

Para el cálculo del porcentaje de eficiencia de cada una de las cajas experimentales se utilizó una regla de tres simple la cual consiste en multiplicar el último valor de concentración de TPHs por cien y dividir para el valor inicial de concentración de TPHs finalmente restarle del 100%.

Análisis Estadístico se basa en comparación de medias tomando por separadas cada bacteria como variables independientes.

Método de comparación IBM SPSS:

Funcionalidad:

- Editor de datos del tipo hoja de cálculo para introducir, modificar y ver archivos de datos.
- Procedimientos estadísticos, incluyendo pruebas t, análisis de varianza y tablas de contingencia.
- Los gráficos interactivos permiten cambiar o añadir elementos del gráfico y variables dinámicamente; los cambios aparecen tan pronto como se especifican.
- Gráficos de alta resolución habituales para un abanico amplio de gráficos y tablas analíticas y de presentación.

Tabla 2 - 3: Valores que utiliza el programa IBM SPSS

EFICIENCIA1	EFICIENCIA2	RESUMEN	VALORES
90	90	01	90
93	90	01	93
92	94	01	92
93	91	01	93
92	90	01	92
		02	90
		02	90
		02	94
		02	91
		02	90

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016

El análisis de varianza (ANOVA) de un factor nos sirve para comparar varios grupos en una variable cuantitativa. Esta prueba es una generalización del contraste de igualdad de medias para dos muestras independiente. Se aplica para contrastar la igualdad de medias de tres o más poblaciones independientes y con distribución normal. Supuestas k poblaciones independientes, las hipótesis del contraste son siguientes:

H0: $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$ Las medias poblacionales son iguales.

H1: Al menos dos medias poblacionales son distintas.

3.2.2.6. Masificación de *Pseudomona putida*:

Después de analizar los resultados de los TPHs se comparó datos durante 10 semanas, se pudo observar el porcentaje de eficiencia más alta con la *Pseudomona putida*. Procedimos a masificar la bacteria.

Se preparó el agar y agua de peptona, luego de la siembra de la bacteria se conservó en la incubadora durante 24h.

Posteriormente el agar cortado en pequeños cuadritos y se colocó en agua de peptona, para que la bacteria asimile el nutriente se le colocó gotas de crudo para que lo empiece a degradar. (Ver anexo: E5)

3.2.2.7. Conservación de *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona putida*:

La finalidad de conservar las bacterias es para que el laboratorio siga con este proceso para remediar sus pasivos ambientales.

Importante esterilizar los tubos con 10mL de leche. Luego que los tubos de leche se enfríen hasta Temperatura ambiente. Con la aza se retira en tanto sea posible todas las bacterias que crecieron en las cajas Petri le ponemos en los tubos de leche estilizados procedemos a tapar bien los tubos y guardarlos en una gradilla y los ponerlos a congelar. (Ver anexo: E6)

3.2.3. Técnica de Landfarming:

Posterior a la deshidratación de los pasivos ambientales en el invernadero, se procedió a implementar la técnica de Landfarming.

La selección y recolección de la materia orgánica empleada en la técnica, fue caracterizada como residuos alimenticios tal es el caso de cáscaras de frutas y verduras en el mercado municipal de la localidad.

Seguidamente se procedió a cortar cada uno de los residuos alimenticios en proporciones más pequeñas para que sea más accesible y optimizar tiempos de tratamiento acelerando consigo la degradación de los residuos dentro del sistema, obteniendo así mejores resultados.

3.2.3.1. Cálculo de dosificación de nutrientes

Relación de Nutrientes

C: N: P Suelo Agrícola

100:10:1 W (Peso)

Donde:

Pcs: Peso suelo contaminado

[TPH]= Concentración de hidrocarburos totales de petróleo

Hay que tomar en cuenta que el porcentaje de Carbono total dentro de los TPHs es del 78 %.

% CTPH= 78 %

Entonces tenemos:

$$W\ TPH = Pcs * [TPH]$$

Relación Carbono: $WC = [TPH] * 0.78$

Relación Nitrógeno: $WN = \frac{WC}{10}$

Relación Fósforo: $WP = \frac{WC}{100}$

Datos:

$$Psc = ?\ kg$$

$$[TPH] = ?\ mg/Kg$$

Cálculos:

$$W\ TPH = Pcs * [TPH]$$

$$W\ TPH = ?\ Kg$$

$$WC = [TPH] * 0.78$$

$$WC = ? Kg$$

$$WN = \frac{WC}{10}$$

$$WN = ? Kg$$

$$WP = \frac{WC}{100}$$

$$WP = ? Kg$$

Concentración de N y P en los fertilizantes.

Úrea = 46 % N

MAP= 11 % N y 52 % P

Cálculo de la Dosificación de nutrientes si se conoce la cantidad de N y P en el suelo.

WPs= Concentración de Fósforo en el suelo (Kg)

WNs= Concentración de Nitrógeno en el suelo (Kg)

Datos:

N total suelo= ? mg/Kg

P disponible suelo= ? mg/Kg

WPs= ? Kg

WNs= ? Kg

Cantidad (kg) a dosificar de MAP considerando el porcentaje de P en el suelo

$$WPM_{ap} = (WP - WPs)$$

$$WPM_{ap} = ? \text{ Kg}$$

$$MAP = (WPM_{ap} / 0,52)$$

$$MAP = ? \text{ Kg}$$

Cantidad (kg) a dosificar de ÚREA considerando el porcentaje de N en el suelo y la cantidad de N en el MAP.

$$WN_{\text{Úrea}} = WN - (WN_s + WN_{MAP})$$

$$WN_{MAP} = ? \text{ Kg}$$

$$WN_{\text{Úrea}} = WN - (WN_s + WN_{MAP})$$

$$WN_{\text{Úrea}} = ? \text{ Kg}$$

3.2.3.2. Control de variables de Landfarming

Landfarming al ser una técnica de biodegradación sencilla y de bajo costo no representa gran dificultad durante el proceso de tratamiento, sin embargo hay que considerar algunas variables que son indispensables en el óptimo desarrollo del tratamiento.

a) Cajas experimentales

Tabla 3 - 3: Tiempo de Control de parámetros de tratamiento en cajas experimentales.

Tiempo de control						
Fecha	Cajas experimentales	TPHs	pH	% de Humedad	Aireación (volteo)	Humectación (irrigación)
14/09/2015	1, 1a, 1b, 1c, 1d, 2, 2a, 2b, 2c, 2d, 2e.	Después de 30 días	Semanalmente		Tres veces por semana (Lunes, miércoles y viernes)	
09/10/2015		Después de 25 días				
28/10/2015		Después de 20 días				
12/11/2015		Después de 15 días				
04/12/2015		Después de 25 días				

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

b) Suelo patrón

Tabla 4 - 3: Tiempo de Control de parámetros de tratamiento al suelo patrón.

Tiempo de control						
Fecha	Muestra patrón	TPHs	pH	% de Humedad	Aireación (volteo)	Humectación (irrigación)
11/07/2015	Muestra patrón en el invernadero	Después de 30 días	Semanalmente		Tres veces por semana (Lunes, miércoles y viernes)	
14/09/2015		Después de 25 días				
09/10/2015		Después de 20 días				

28/10/2015		Después de 15 días		
12/11/2015		Después de 25 días		
04/12/2015		Después de 25 días		
21/12/2015		Después de 20 días		
04/01/2016		Después de 15 días		

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

3.2.4. Comparación con la Legislación vigente en el Ecuador:

A través del Decreto Ejecutivo 1215 del Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas del Ecuador (RAOHE), se referencia la siguiente investigación por medio de la Tabla 6: Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicios. (Ver anexo: C)

3.2.5. Metodología para la elaboración del Manual de Procedimiento:

Constan de los siguientes procedimientos:

1. Procedimiento para la preparación del agar PCA.
2. Procedimiento para la preparación del agua de peptona.
3. Procedimiento para la activación de la cepa.
4. Procedimiento para el análisis de TPHs.
5. Procedimiento para la masificación de *Pseudomonas putida*.
6. Procedimiento para la conservación de la cepa.
7. Procedimiento para la aplicación de Landfarming y control de variables.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la comparación de eficiencia se pretendía la recopilación de variedad de datos con los que se interpretaría de mejor manera los resultados obtenidos, a través de comparaciones numéricas y estadísticas.

El control de las variables de tratamiento se monitoreaba constantemente para alcanzar y mantener rangos óptimos para el desarrollo y crecimiento de microorganismos acelerando consigo el proceso de degradación de TPHs.

La caracterización inicial sustentó el plan de tratamiento, proporcionando la información verídica del punto de partida. Un control intermedio que sirvió para estabilizar los parámetros de control y un final para evaluar la eficiencia del proceso.

4.1. Caracterización físico-química y microbiológica de los pasivos ambientales de petróleo del Laboratorio AqLab

Al realizar la caracterización de los pasivos ambientales del Laboratorio se evidencia que los TPH se encuentran fuera del rango permitido al igual que los UFC totales por lo que el sedimento no se pudo dar la disposición final responsable a fin con la norma vigente en el país. Los resultados iniciales se presentan en la tabla 1-4, los medios para control microbiano en la tabla 2-4 y los finales en la tabla 3-4 respectivamente.

Tabla 1 - 4: Análisis iniciales físico-químicos y microbiológicos

FECHA	VARIABLES DE CONTROL	RESULTADOS	LÍMITES PERMISIBLES
10/09/2015	pH	6,8	5 a 9
	Temperatura	19°C	(25 a 35)°C
	Humedad	90%	(50 a 70)%
	TPHs	125000 mg/Kg	< 2500 mg/Kg
	UFC Totales	2,1exp5	1exp6

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

Tabla 2 - 4: Análisis intermedios físico-químicos y microbiológicos

FECHA	VARIABLES DE CONTROL	RESULTADOS	LÍMITES PERMISIBLES
04/11/2015	pH	7,4	5 a 9
	Temperatura	35°C	(25 a 35)°C
	Humedad	65%	(50 a 70)%
	TPHs	50000mg/Kg	< 2500 mg/Kg
	UFC <i>Pseudomona</i>	3,1exp8	1exp6

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

Tabla 3 - 4: Análisis finales físico-químicos y microbiológicos

FECHA	VARIABLES DE CONTROL	RESULTADOS	LÍMITES PERMISIBLES
08/03/2016	pH	7,4	5 a 9
	Temperatura	30°C	(25 a 35)°C
	Humedad	65%	(50 a 70)%
	TPHs	2135mg/Kg	< 2500 mg/Kg
	UFC <i>Pseudomona</i>	1,0exp2	1exp6

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

4.2. Comparación de eficiencia de degradación de TPHs:

4.2.1. Resultados de los análisis de la caja código 1

Se analizó las variables de control de tratamiento como TPHs, pH, temperatura y humedad durante cuatro meses cuyos resultados de la caja código 1 se presenta en la tabla 4-4, evidenciándose la disminución de los TPHs considerablemente, mientras que las otras variables de tratamientos oscilaban en rangos óptimos de tratamiento.

Tabla 4 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 1

	FECHA	pH	Humedad %	Temperatura °C	TPHs (mg/Kg)
EFICIENCIA 88,8 %	14/09/2015	6,5	45	30	110000
	09/10/2015	6,5	60	29	80000
	28/10/2015	6,1	45	31	32000
	12/11/2015	6,8	56	30	16974
	04/12/2015	6,1	65	29	12276
Límite máx permisible Tabla 6 del RAOHE		5 a 9	Controlada	Controlada	< 2500

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

El potencial de hidrógeno (pH) debe estar en un rango de 5 a 9 y la caja 1 durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo dentro del rango establecido. El valor más alto encontrado fue 6,80, el valor más bajo 6,10 y el valor promedio es 6,40.

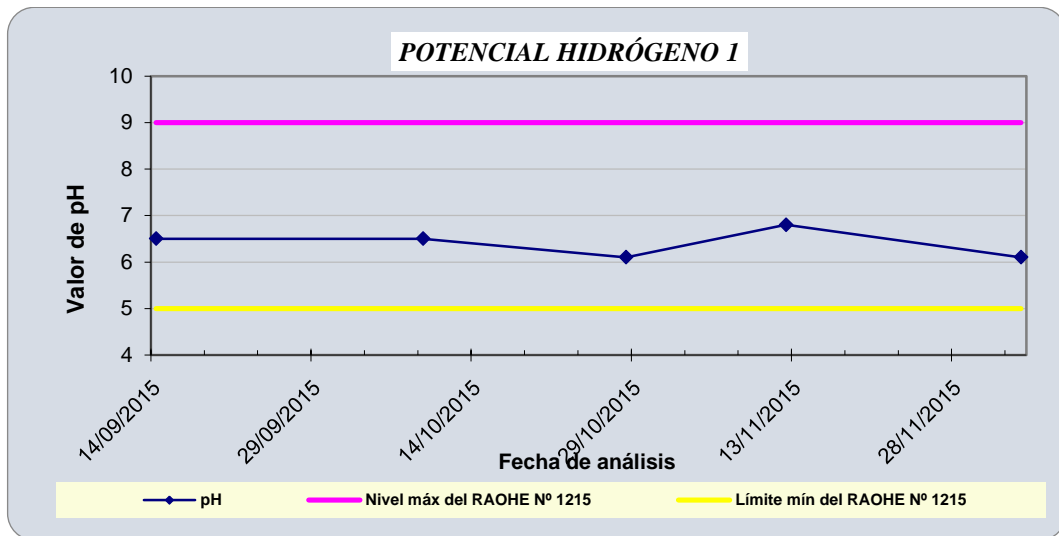


Gráfico 2 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Temperatura debe estar en un rango de 25°C a 35°C y la caja 1 durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una temperatura promedio 30°C siendo el valor más alto 31°C y el más bajo 29°C.

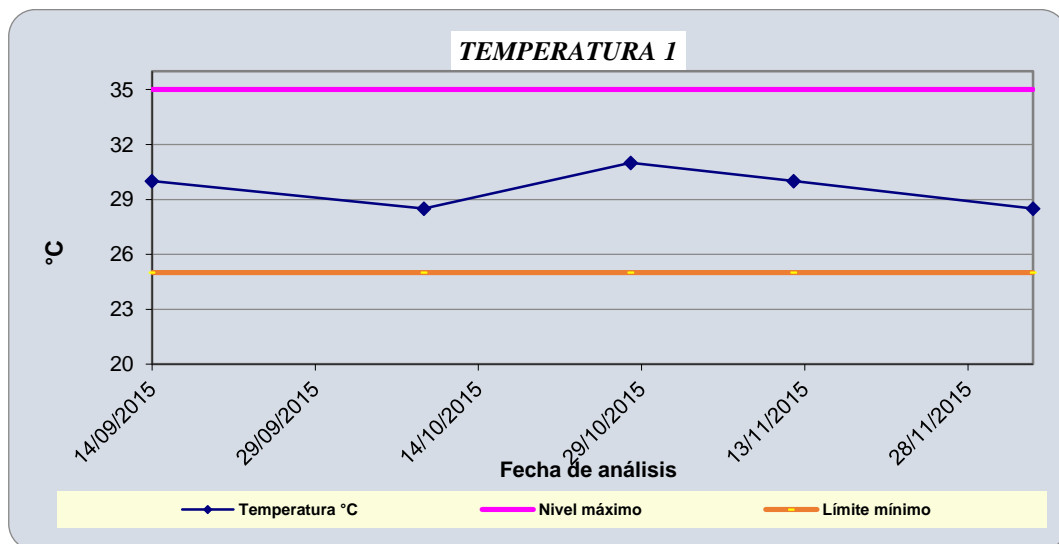


Gráfico 3 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Humedad debe estar en un rango de 50°C a 70°C y la caja 1 durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una Humedad promedio de 54%.

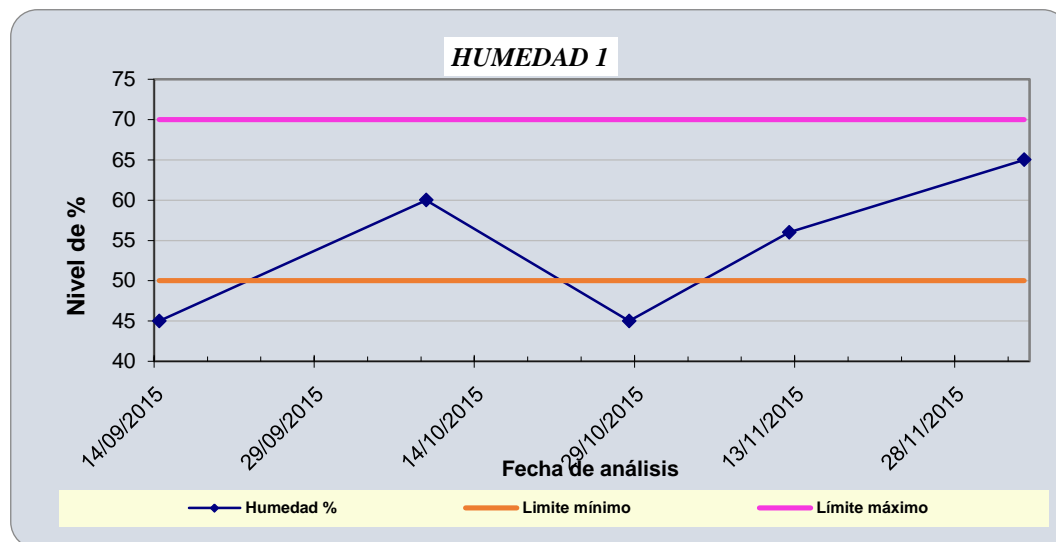


Gráfico 4 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

Para los TPHs en suelo agrícola su límite permisible debe ser < 2500mg/Kg según la tabla #6 del RAOHE, Decreto Ejecutivo 1215 y la caja 1 durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs de 110000 mg/Kg bajó a 12276 mg/Kg teniendo una eficiencia del 88,8%.

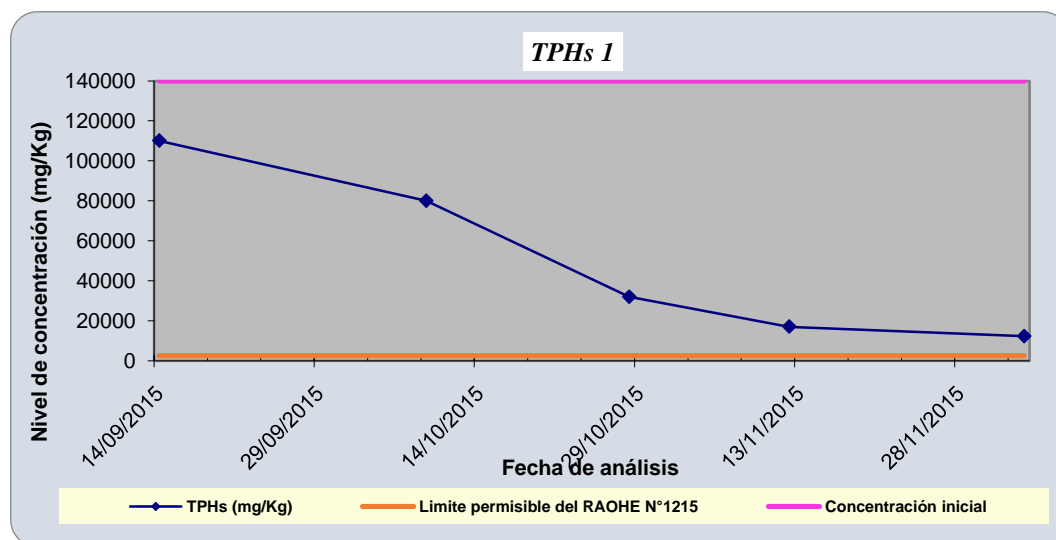


Gráfico 5 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

4.2.2. Resultados de los análisis de la caja código 1a

Se analizó las variables de control de tratamiento como TPHs, pH, temperatura y humedad durante cuatro meses cuyos resultados de la caja código 1a se presenta en la tabla 5-4, evidenciándose la disminución de los TPHs considerablemente, mientras que las otras variables oscilaban en rangos óptimos de tratamiento.

Tabla 5 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 1a

Microorganismo	FECHA	pH	Humedad %	Temperatura °C	TPHs (mg/Kg)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	14/09/2015	6,9	55	29	107000
	09/10/2015	6,9	68	31	60000
	28/10/2015	6,3	58	34	59000
EFICIENCIA 89,8 %	12/11/2015	7,0	68	32	18182
	04/12/2015	6,3	63	31	10932
Límite máx permisible Tabla 6 del RAOHE		5 a 9	Controlada	Controlada	2500

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

El potencial de hidrógeno (pH) debe estar en un rango de 5 a 9 y la caja 1a durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo dentro del rango establecido. Su valor más alto fue 7,0, el valor más bajo 6,30 y el valor promedio es 6,68.

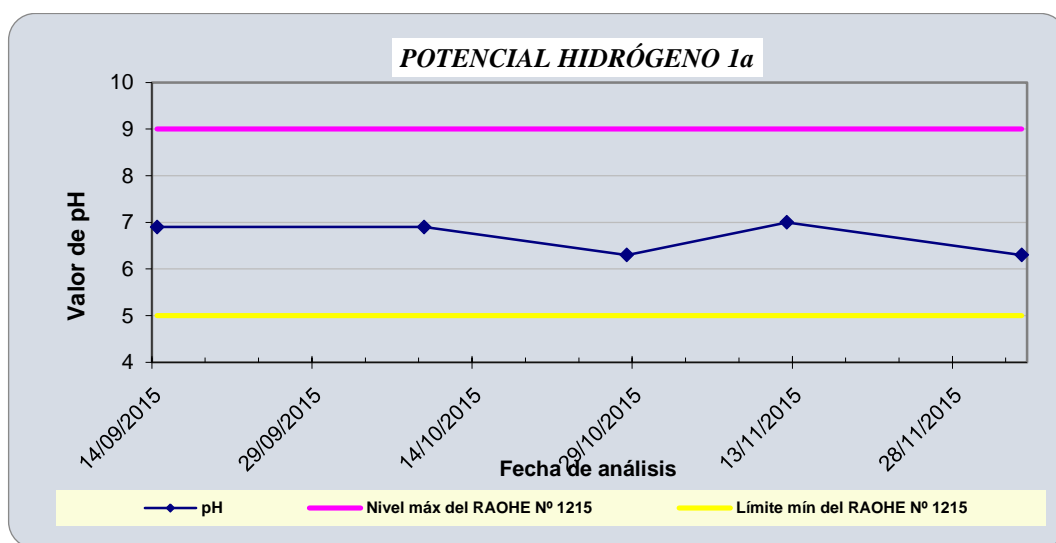


Gráfico 6 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1a.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Temperatura debe estar en un rango de 25°C a 35°C y la caja 1a durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una temperatura promedio 31°C siendo el valor alto 34°C y el más bajo 29°C.

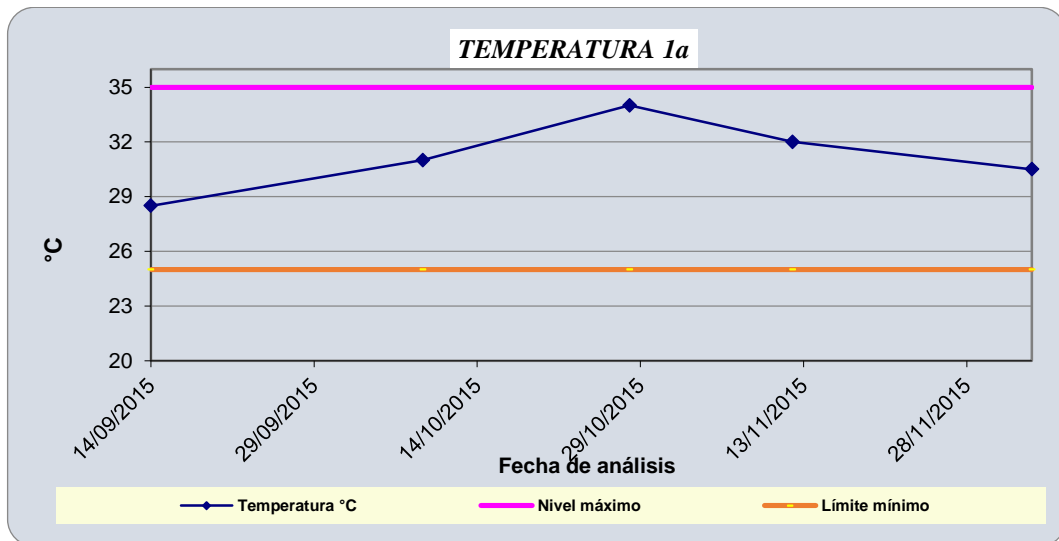


Gráfico 7 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1a.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Humedad debe estar en un rango de 50°C a 70°C y la caja 1a durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una Humedad promedio de 62%.

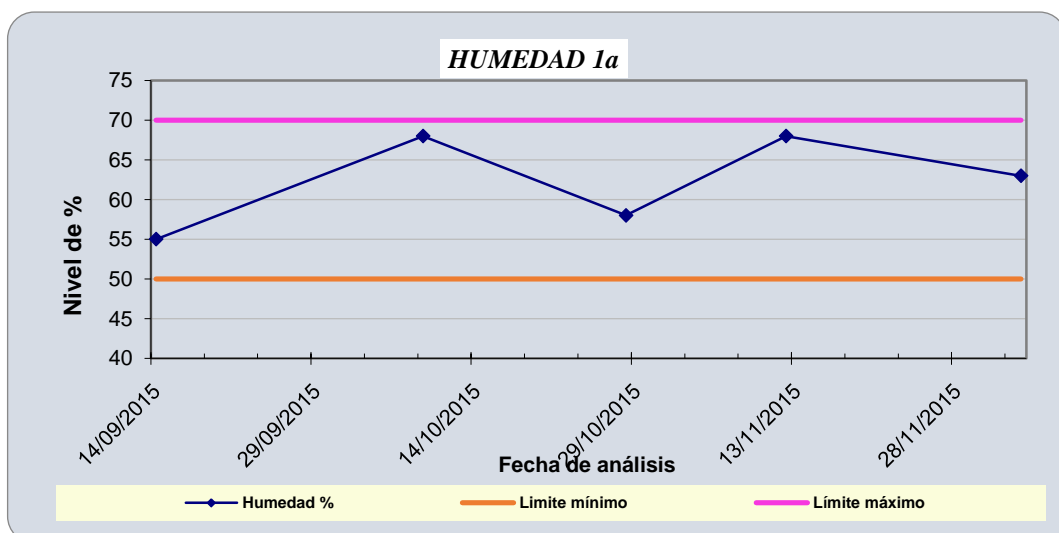


Gráfico 8 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1a.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

Para los TPHs en suelo agrícola su límite permisible debe ser < 2500mg/Kg según la tabla #6 del RAOHE, Decreto Ejecutivo 1215 y la caja 1a durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs de 107000 mg/Kg bajo a 10932 mg/Kg teniendo una eficiencia del 89,8%.

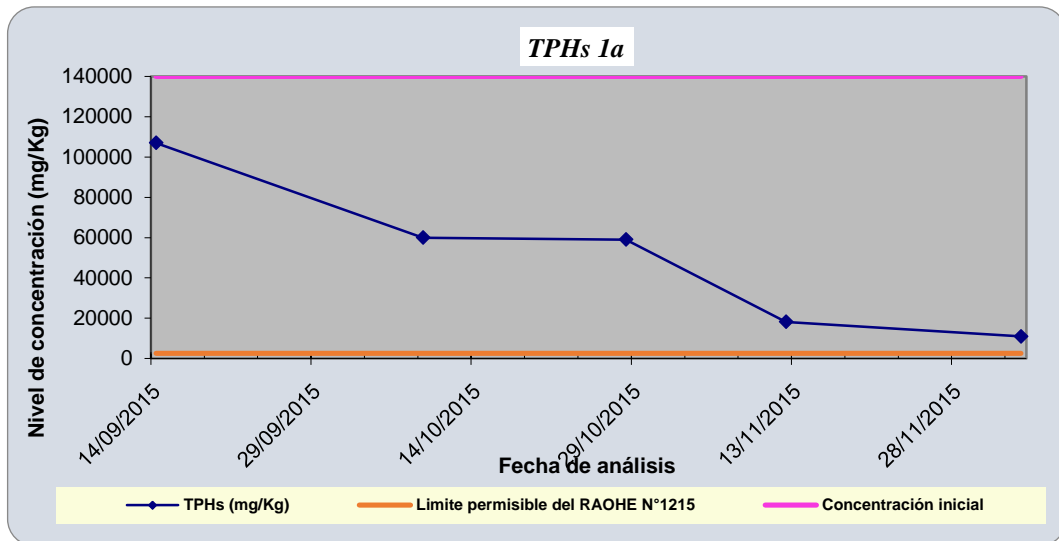


Gráfico 9 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1a.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

4.2.3. Resultados de los análisis de la caja código 1b

Se analizó las variables de control de tratamiento como TPHs, pH, temperatura y humedad durante cuatro meses cuyos resultados de la caja código 1b se presenta en la tabla 6-4, evidenciándose la disminución de los TPHs considerablemente, mientras que las otras variables oscilaban en rangos óptimos de tratamiento.

Tabla 6 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 1b

Microorganismo	FECHA	pH	Humedad %	Temperatura °C	TPHs (mg/Kg)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	14/09/2015	7,1	60	27	109000
	09/10/2015	7,1	65	29	78000
	28/10/2015	5,9	75	29	40000
EFICIENCIA 93,2 %	12/11/2015	7,0	72	28	15826
	04/12/2015	6,9	70	30	7427
Límite máx permisible Tabla 6 del RAOHE		5 a 9	Controlada	Controlada	2500

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

El potencial de hidrógeno (pH) debe estar en un rango de 5 a 9 y la caja 1b durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo dentro del rango establecido. El valor más alto fue 7,1 y el valor más bajo 5, el valor promedio es 6,8.

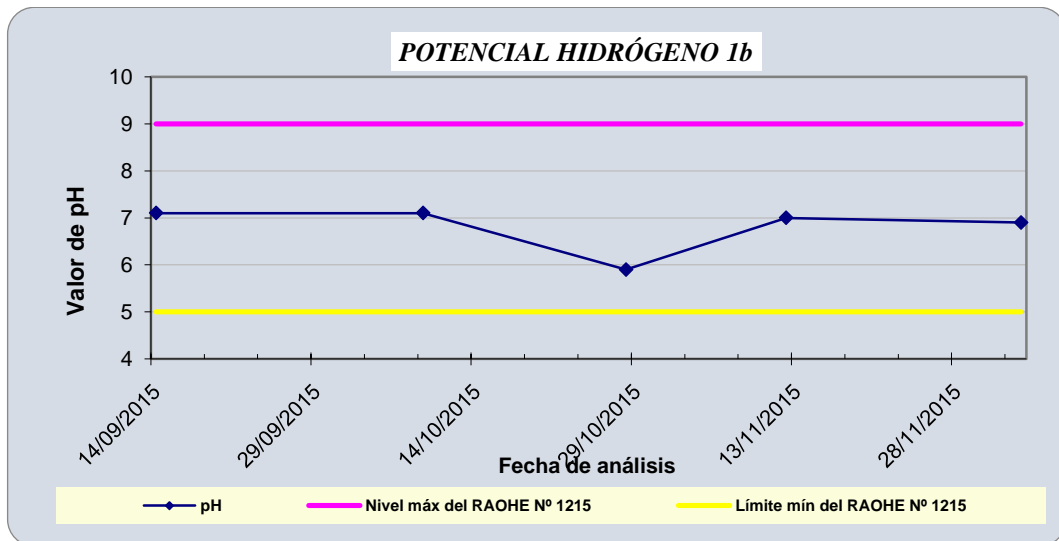


Gráfico 10 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1b.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Temperatura debe estar en un rango de 25°C a 35°C y la caja 1b durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una temperatura promedio 28°C siendo el valor alto 30°C y el más bajo 27°C.

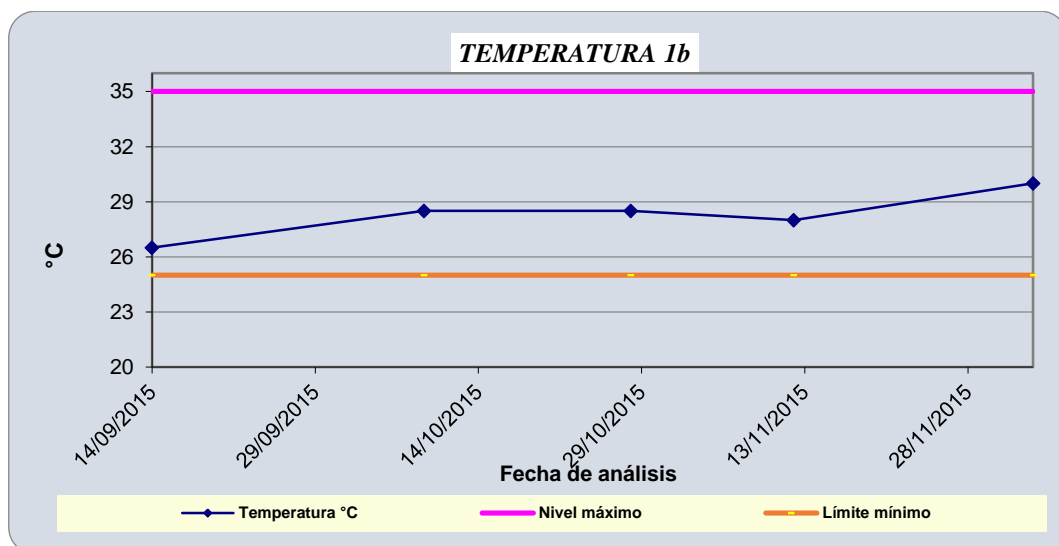


Gráfico 11 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1b.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Humedad debe estar en un rango de 50°C a 70°C y la caja 1b durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una Humedad promedio de 68%.

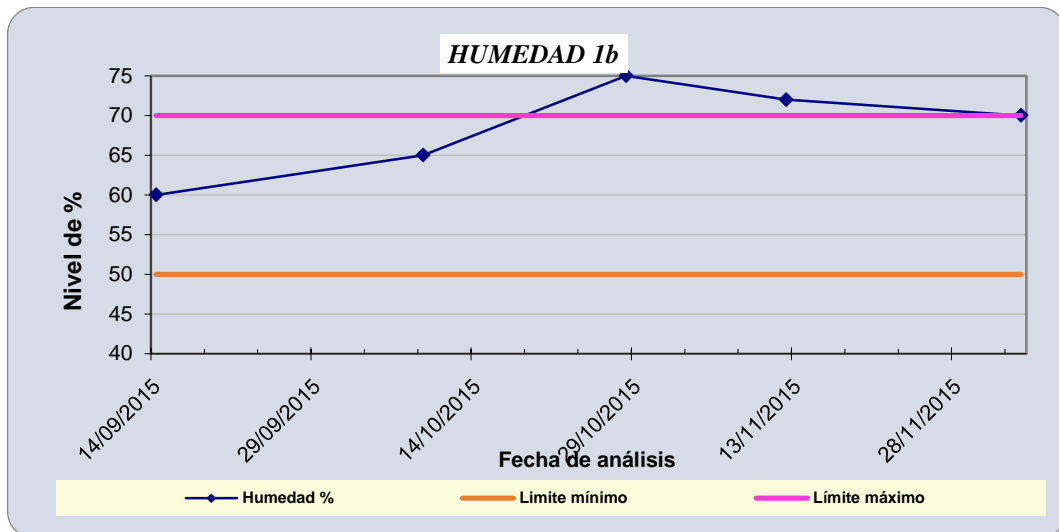


Gráfico 12 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1b.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

Para los TPHs en suelo agrícola su límite permisible debe ser < 2500mg/Kg según la tabla #6 del RAOHE, Decreto Ejecutivo 1215 y la caja 1b durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs de 109000 mg/Kg bajo a 7427 mg/Kg teniendo una eficiencia del 93,2%.

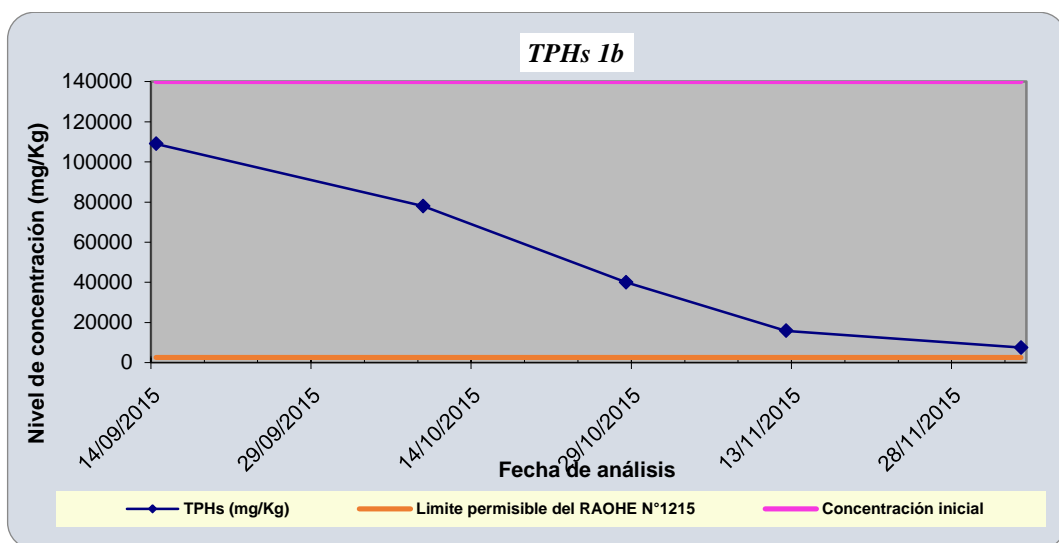


Gráfico 13 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1b.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

4.2.4. Resultados de los análisis de la caja código 1c

Se analizó las variables de control de tratamiento como TPHs, pH, temperatura y humedad durante cuatro meses cuyos resultados de la caja código 1c se presenta en la tabla 7-4, evidenciándose la disminución de los TPHs considerablemente, mientras que las otras variables oscilaban en rangos óptimos de tratamiento.

Tabla 7 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 1c

Microorganismo	FECHA	pH	Humedad %	Temperatura °C	TPHs (mg/Kg)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	14/09/2015	6,8	55	29	111000
	09/10/2015	7,3	68	30	65000
	28/10/2015	6,8	60	27	48000
EFICIENCIA 92,1 %	12/11/2015	6,8	75	30	12330
	04/12/2015	7,0	65	29	8779
Límite máx permisible Tabla 6 del RAOHE		5 a 9	Controlada	Controlada	2500

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

El potencial de hidrógeno (pH) debe estar en un rango de 5 a 9 y la caja 1c durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo dentro del rango establecido. Su valor alto fue 7,3 y el valor más bajo 6,8 el valor promedio es 6,9.

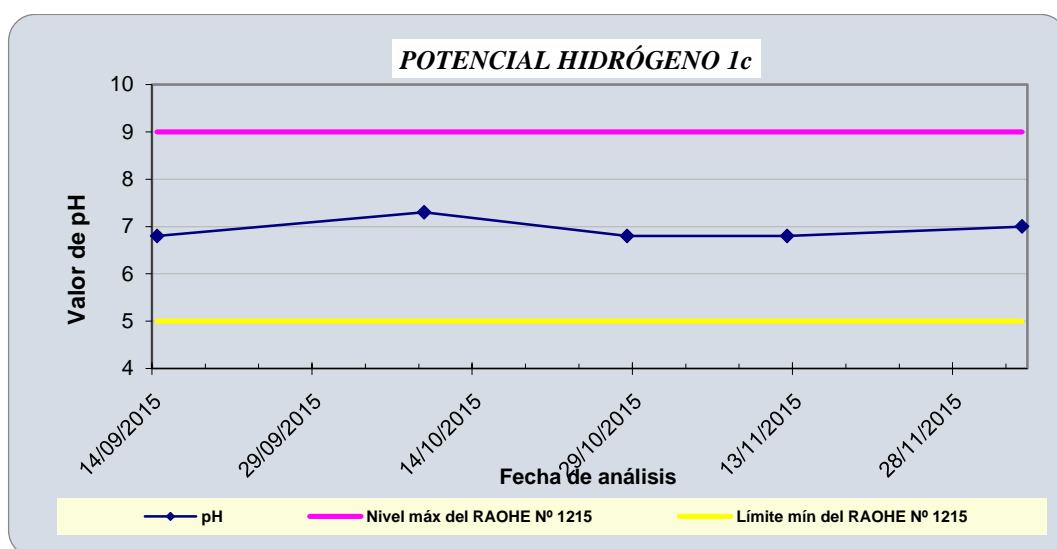


Gráfico 14 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1c.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Temperatura debe estar en un rango de 25°C a 35°C y la caja 1c durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una temperatura promedio 29°C siendo el valor más alto 30°C y el más bajo 27°C.

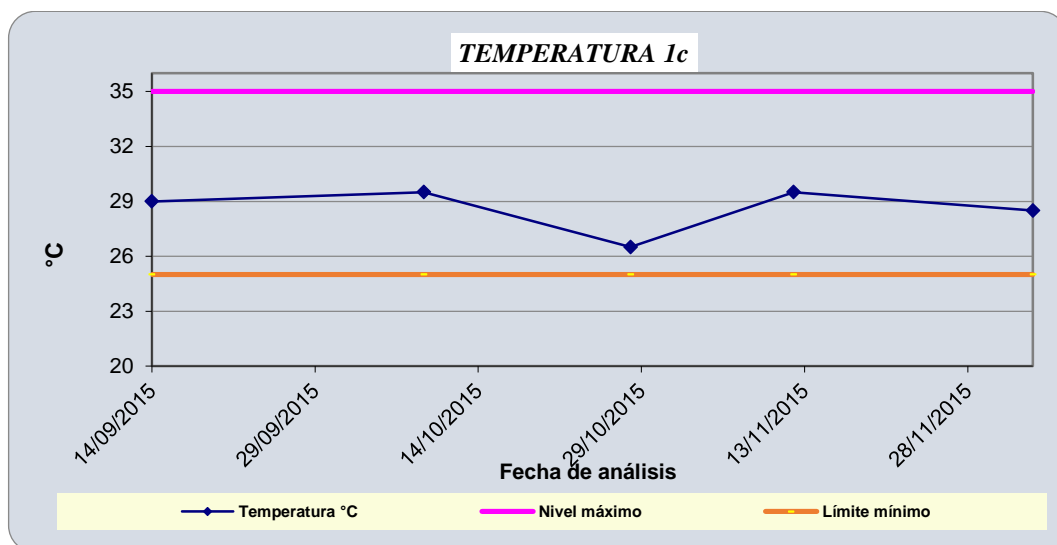


Gráfico 15 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1c.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Humedad debe estar en un rango de 50°C a 70°C y la caja 1c durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una Humedad promedio de 65%.

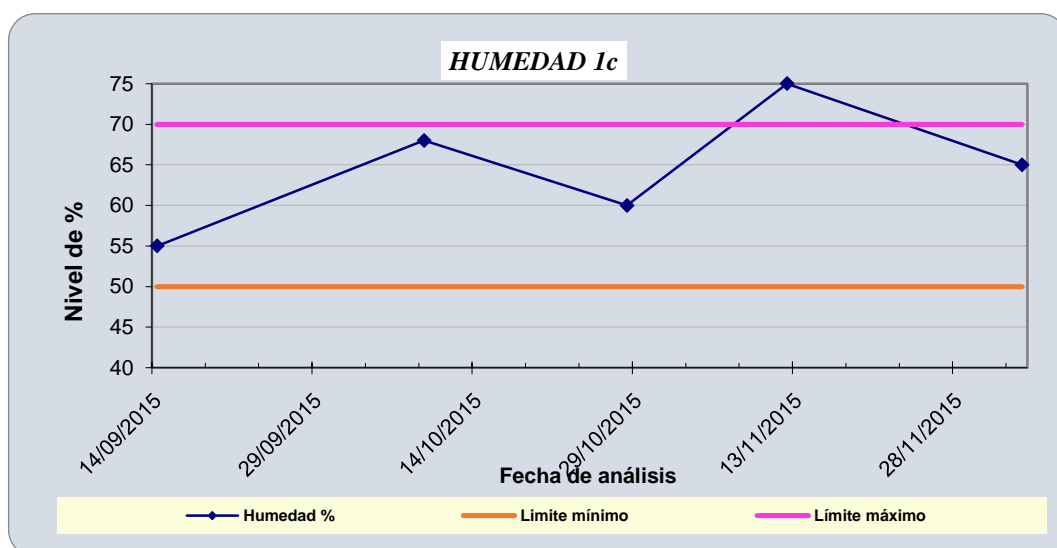


Gráfico 16 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1c.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

Para los TPHs en suelo agrícola su límite permisible debe ser < 2500mg/Kg según la tabla #6 del RAOHE, Decreto Ejecutivo 1215 y la caja 1c durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs de 111000 mg/Kg bajo a 8779 mg/Kg teniendo una eficiencia del 92,1%.

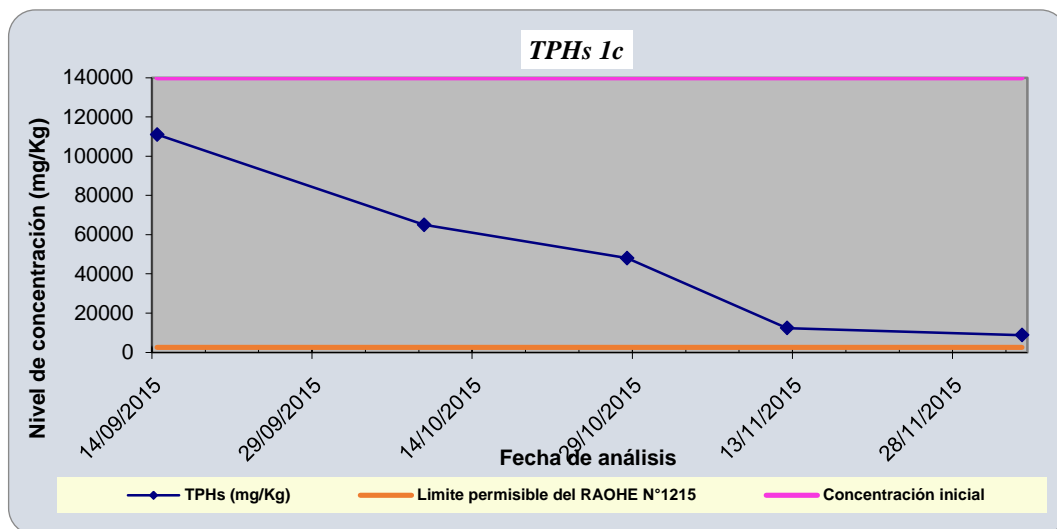


Gráfico 17 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1c.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

4.2.5. Resultados de los análisis de la caja código 1d

Se analizó las variables de control de tratamiento como TPHs, pH, temperatura y humedad durante cuatro meses cuyos resultados de la caja código 1d se presenta en la tabla 8-4, evidenciándose la disminución de los TPHs considerablemente, mientras que las otras variables oscilaban en rangos óptimos de tratamiento.

Tabla 8 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 1d

Microorganismo	FECHA	pH	Humedad %	Temperatura °C	TPHs (mg/Kg)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	14/09/2015	6,5	45	30	125000
	09/10/2015	6,5	70	30	73000
	28/10/2015	6,5	55	29	50000
EFICIENCIA 93,1	12/11/2015	6,5	68	30	14322
	04/12/2015	6,8	65	29	8584
Límite máx permisible Tabla 6 del RAOHE		5 a 9	Controlada	Controlada	2500

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

El potencial de hidrógeno (pH) debe estar en un rango de 5 a 9 y la caja 1d durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo dentro del rango establecido. Su valor más alto fue 6,8 y el valor más bajo 6,5 el valor promedio es 6,6.

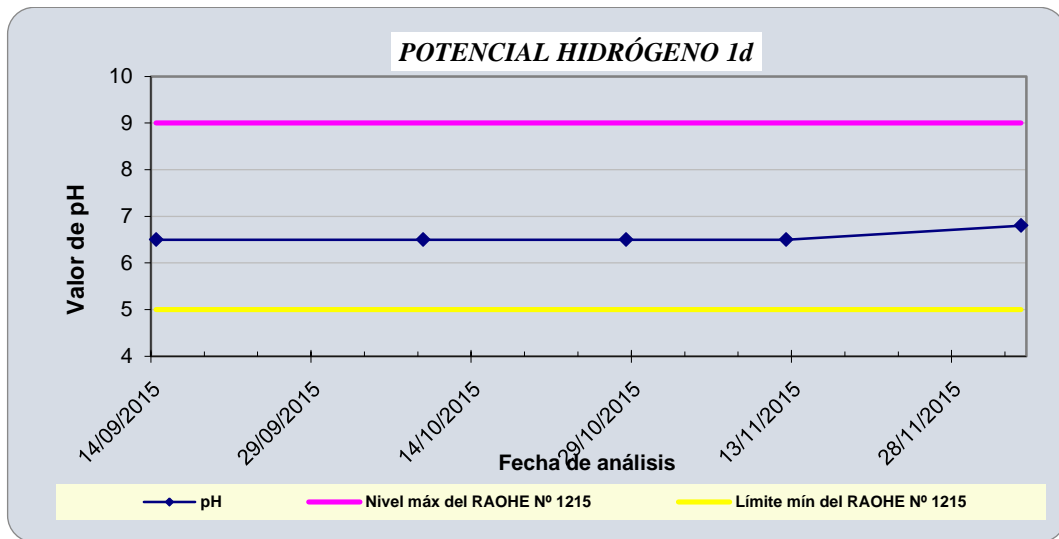


Gráfico 18 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1d.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Temperatura debe estar en un rango de 25°C a 35°C y la caja 1d durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una temperatura promedio 30°C siendo el valor más alto 30°C y el más bajo 29°C.

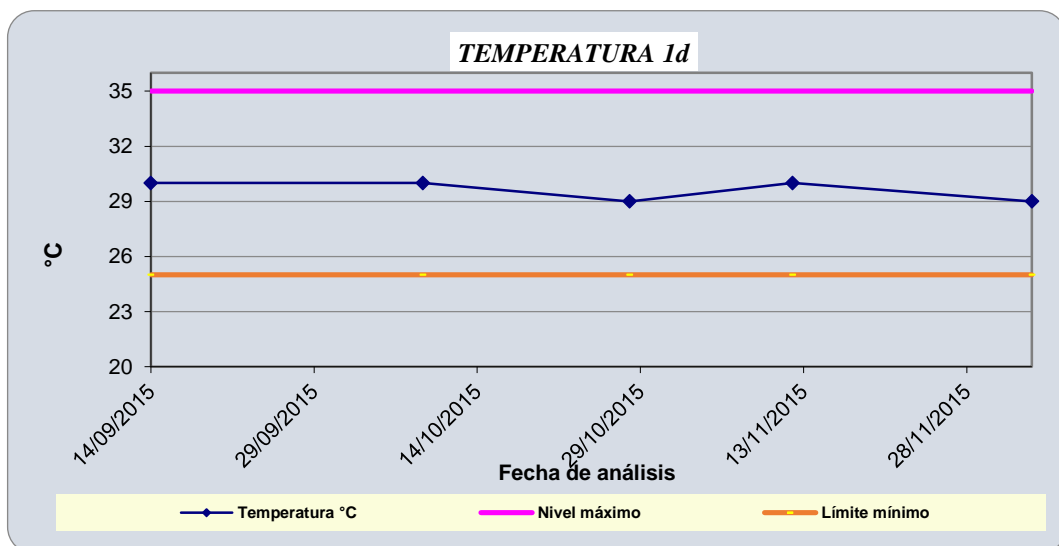


Gráfico 19 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1d.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Humedad debe estar en un rango de 50°C a 70°C y la caja 1d durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una Humedad promedio de 61%.

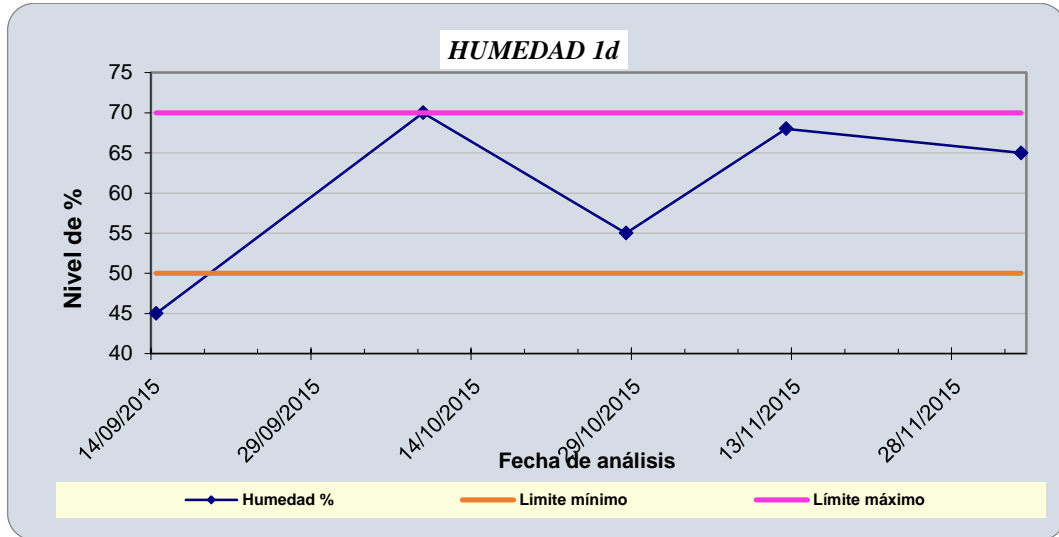


Gráfico 20 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1d.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

Para los TPHs en suelo agrícola su límite permisible debe ser < 2500mg/Kg según la tabla #6 del RAOHE, Decreto Ejecutivo 1215 y la caja 1d durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs de 125000 mg/Kg bajo a 8584 mg/Kg teniendo una eficiencia del 93,1%.

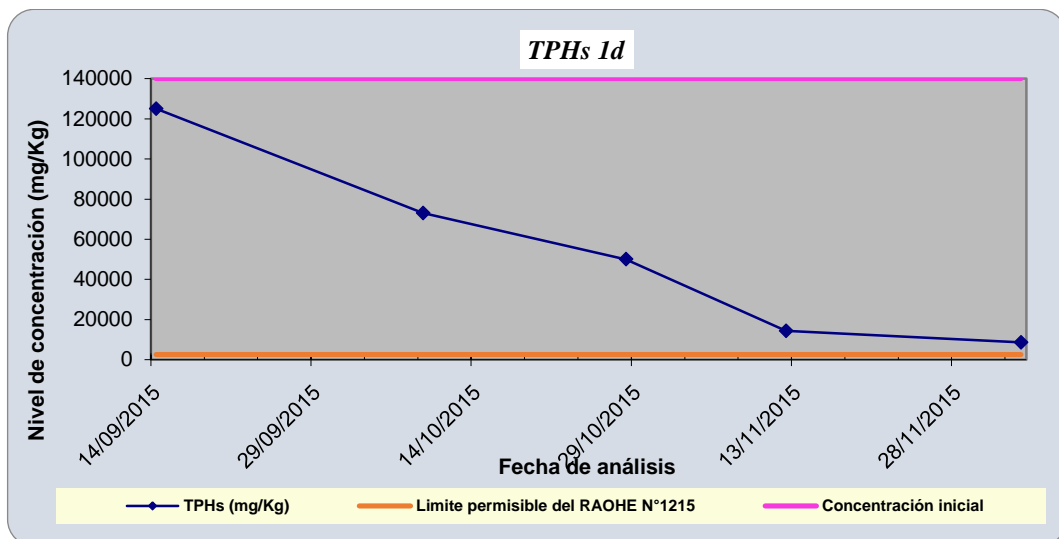


Gráfico 21 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1d.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

4.2.6. Resultados de los análisis de la caja código 1e

Se analizó las variables de control de tratamiento como TPHs, pH, temperatura y humedad durante cuatro meses cuyos resultados de la caja código 1e se presenta en la tabla 9-4, evidenciándose la disminución de los TPHs considerablemente, mientras que las otras variables oscilaban en rangos óptimos de tratamiento.

Tabla 9 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 1e

Microorganismo	FECHA	pH	Humedad %	Temperatura °C	TPHs (mg/Kg)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	14/09/2015	6,7	45	29	113000
	09/10/2015	6,9	69	29	67000
	28/10/2015	6,7	50	30	45000
EFICIENCIA 92	12/11/2015	6,7	56	30	15656
	04/12/2015	7,0	67	31	9024
Límite máx permisible Tabla 6 del RAOHE		5 a 9	Controlada	Controlada	2500

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

El potencial de hidrógeno (pH) debe estar en un rango de 5 a 9 y la caja 1e durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo dentro del rango establecido. Su valor alto fue 7,0 y el valor más bajo 6,70 el valor promedio es 6,80.

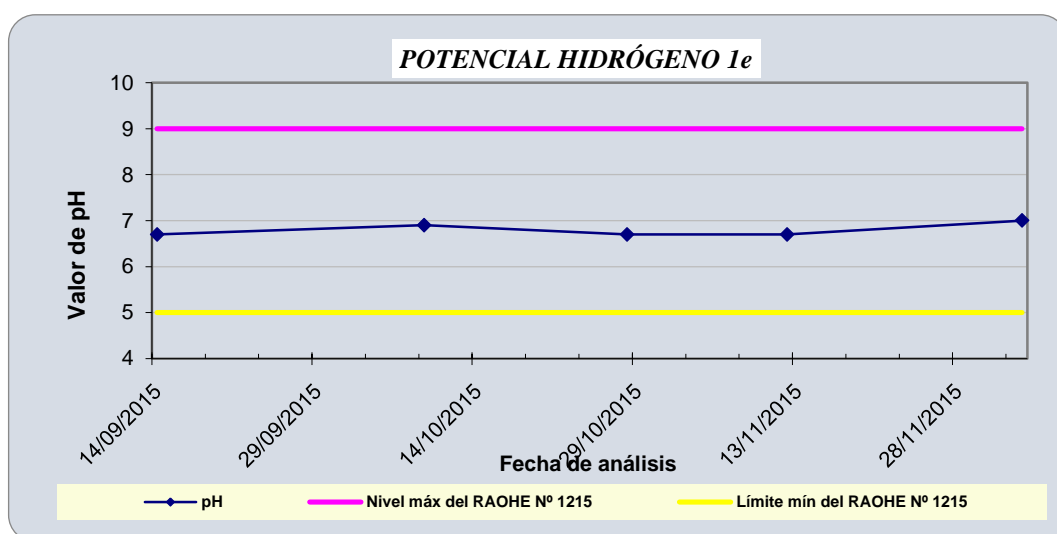


Gráfico 22 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1e.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Temperatura debe estar en un rango de 25°C a 35°C y la caja 1e durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una temperatura promedio 30°C siendo el valor más alto 31°C y el más bajo 29°C.

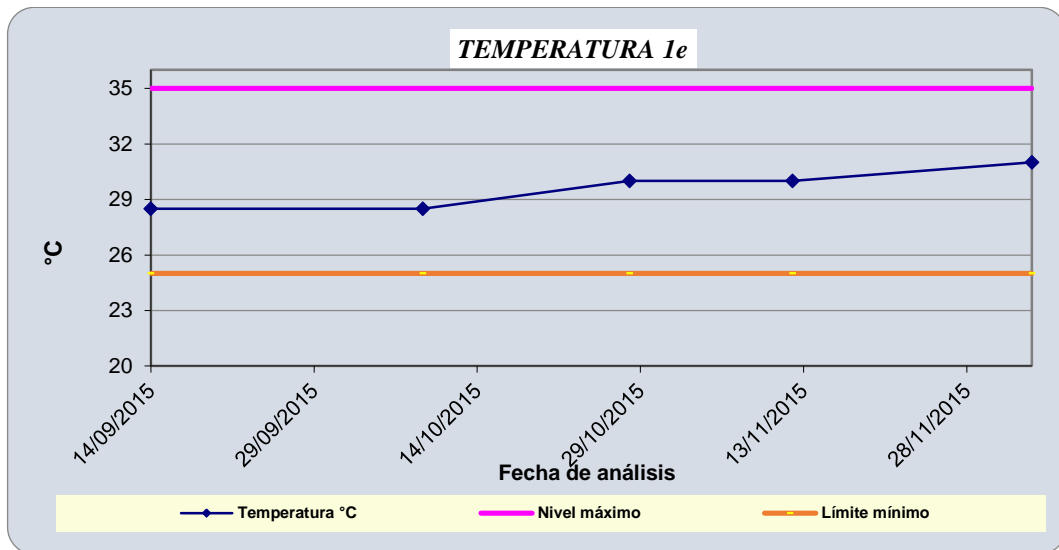


Gráfico 23 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1e.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Humedad debe estar en un rango de 50°C a 70°C y la caja 1e durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una Humedad promedio de 57%.

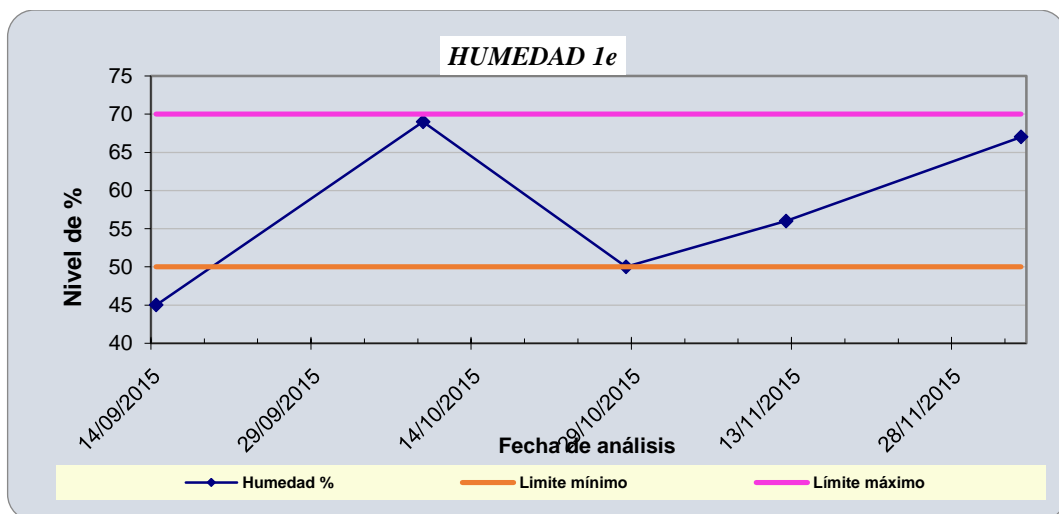


Gráfico 24 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1e.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

Para los TPHs en suelo agrícola su límite permisible debe ser < 2500mg/Kg según la tabla #6 del RAOHE, Decreto Ejecutivo 1215 y la caja 1e durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs de 113000 mg/Kg bajo a 9024 mg/Kg teniendo una eficiencia del 92,0%.

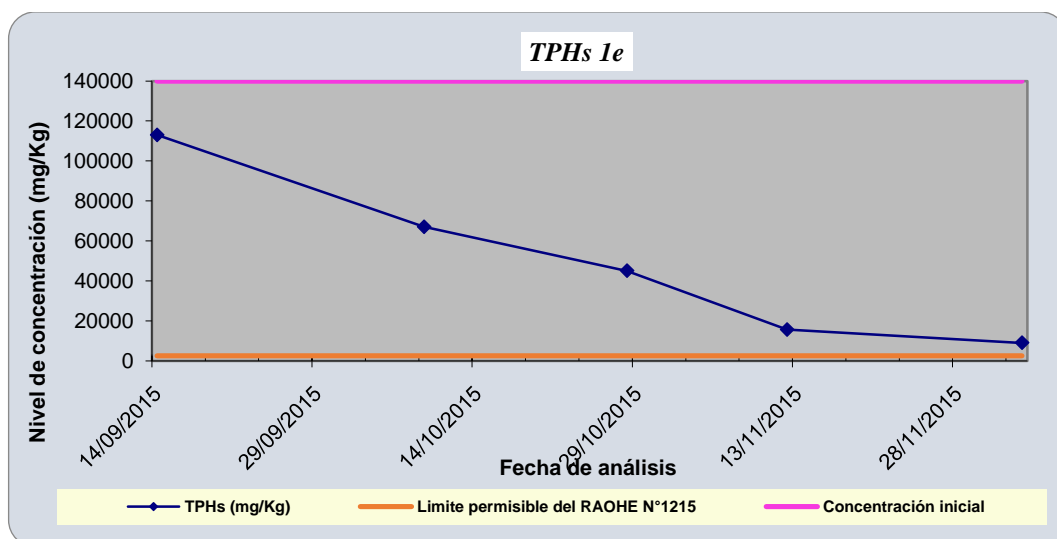


Gráfico 25 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1e.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

4.2.7. Resultados de los análisis de la caja código 2

Se analizó las variables de control de tratamiento como TPHs, pH, temperatura y humedad durante cuatro meses cuyos resultados de la caja código 2 se presenta en la tabla 10-4, evidenciándose la disminución de los TPHs considerablemente, mientras que las otras variables oscilaban en rangos óptimos de tratamiento.

Tabla 10 – 4: Resultados de los análisis de la caja código 2

	FECHA	pH	Humedad %	Temperatura °C	TPHs (mg/Kg)
	14/09/2015	6,1	50	29	106000
	09/10/2015	7,1	59	32	70000
	28/10/2015	6,1	70	29	31000
EFICIENCIA	12/11/2015	6,1	65	29	14619
	04/12/2015	7,0	65	29	13184
87,6 %					
Límite máx permisible Tabla 6 del RAOHE		5 a 9	Controlada	Controlada	2500

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

El potencial de hidrógeno (pH) debe estar en un rango de 5 a 9 y la caja 2 durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo dentro del rango establecido. Su valor alto fue 7,10 y el valor más bajo 6,10 el valor promedio es 6,48.

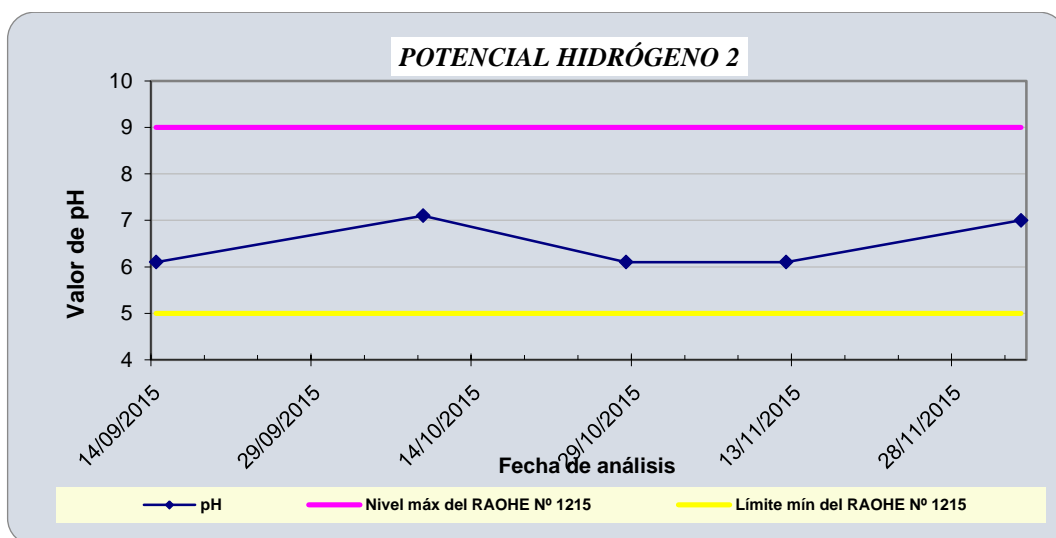


Gráfico 26 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Temperatura debe estar en un rango de 25°C a 35°C y la caja 2 durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una temperatura promedio 29°C siendo el valor alto 32°C y el más bajo 29°C.

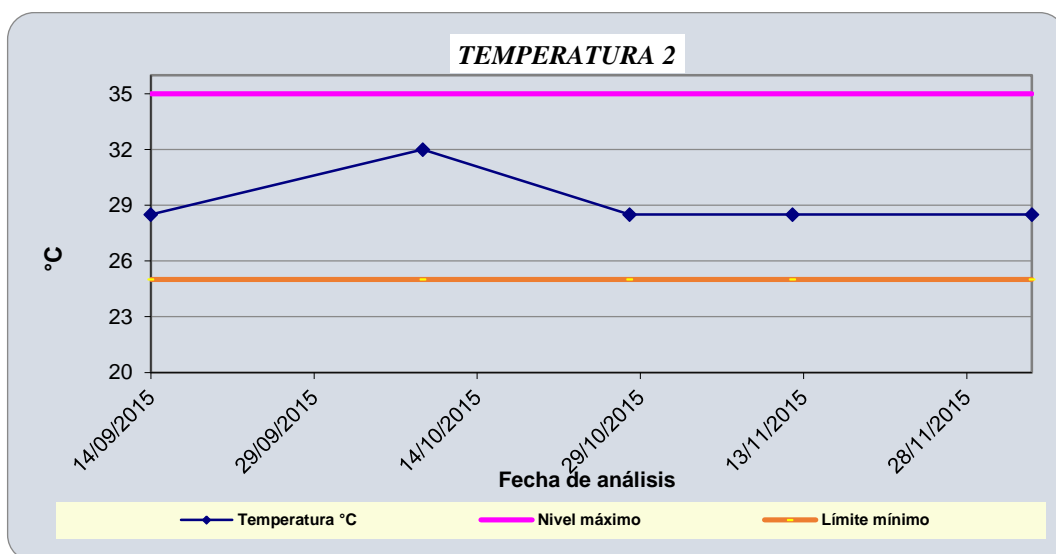


Gráfico 27 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Humedad debe estar en un rango de 50°C a 70°C y la caja 2 durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una Humedad promedio de 62%.

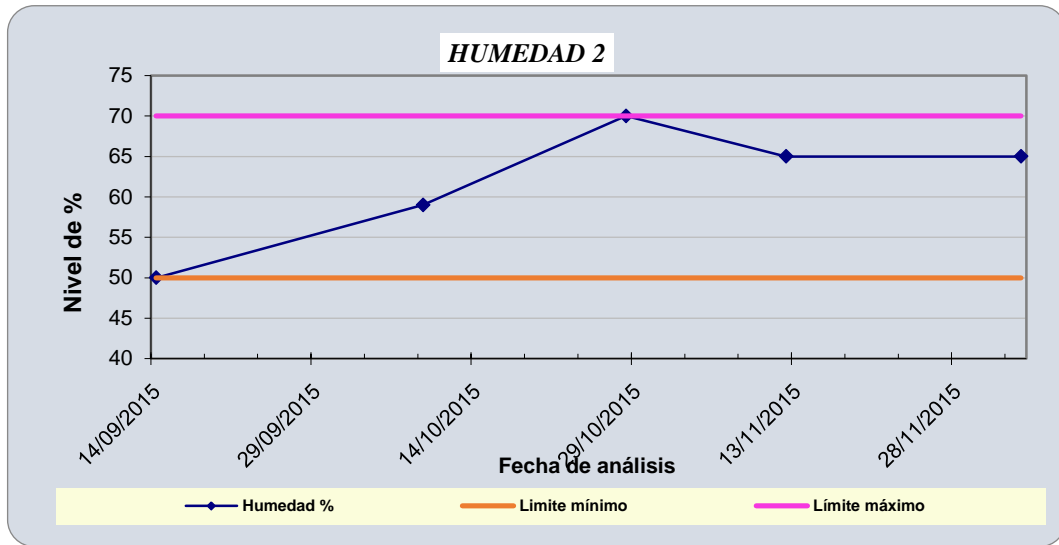


Gráfico 28 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

Para los TPHs en suelo agrícola su límite permisible debe ser < 2500mg/Kg según la tabla #6 del RAOHE, Decreto Ejecutivo 1215 y la caja 2 durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs de 106000 mg/Kg bajo a 13184 mg/Kg teniendo una eficiencia del 87,6%.

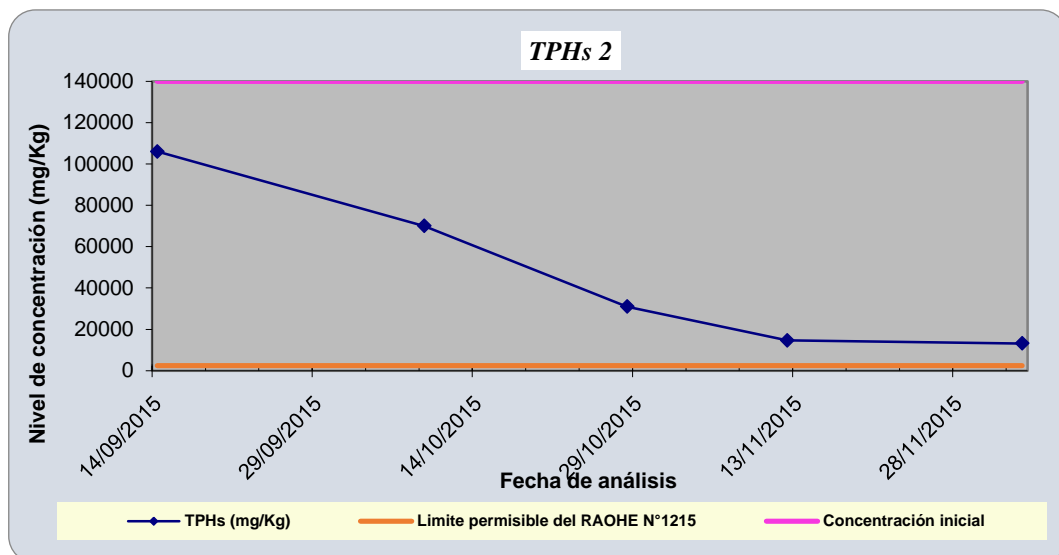


Gráfico 29 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

4.2.8. Resultados de los análisis de la caja código 2a

Se analizó las variables de control de tratamiento como TPHs, pH, temperatura y humedad durante cuatro meses cuyos resultados de la caja código 2a se presenta en la tabla 11-4, evidenciándose la disminución de los TPHs considerablemente, mientras que las otras variables oscilaban en rangos óptimos de tratamiento.

Tabla 11 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 2a

Microorganismo	FECHA	pH	Humedad %	Temperatura °C	TPHs (mg/Kg)
<i>Pseudomona putida</i>	14/09/2015	6,3	35	25	109000
	09/10/2015	6,8	50	28	76000
	28/10/2015	6,3	75	31	40000
EFICIENCIA 90,2 %	12/11/2015	6,3	56	31	14645
	04/12/2015	6,8	65	31	10717
Límite máx permisible Tabla 6 del RAOHE		5 a 9	Controlada	Controlada	2500

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

El potencial de hidrógeno (pH) debe estar en un rango de 5 a 9 y la caja 2a durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo dentro del rango establecido. Su valor alto fue 6,80 y el valor más bajo 6,30 el valor promedio es 6,50.

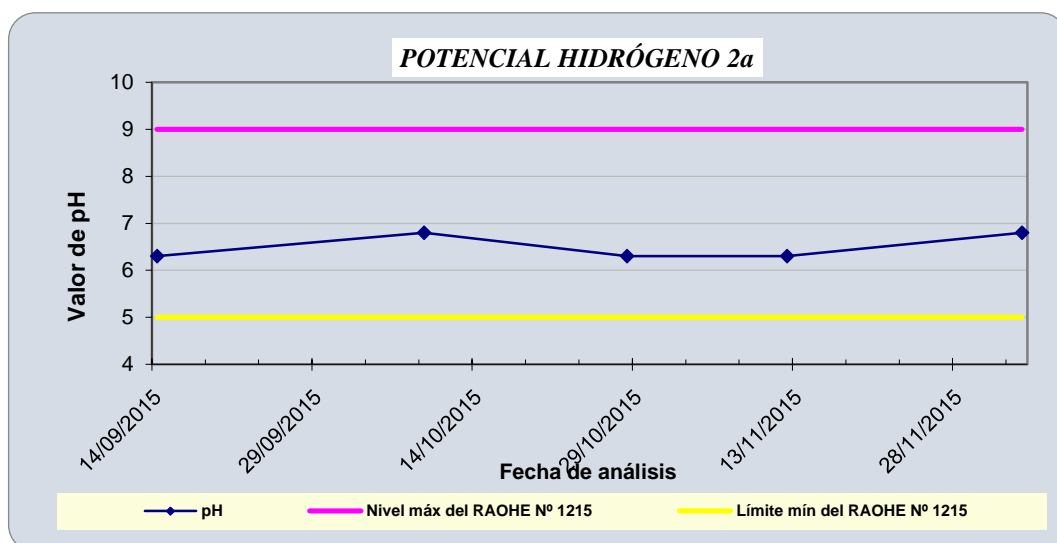


Gráfico 30 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2a.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Temperatura debe estar en un rango de 25°C a 35°C y la caja 2a durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una temperatura promedio 29°C siendo el valor más alto 31°C y el más bajo 25°C.

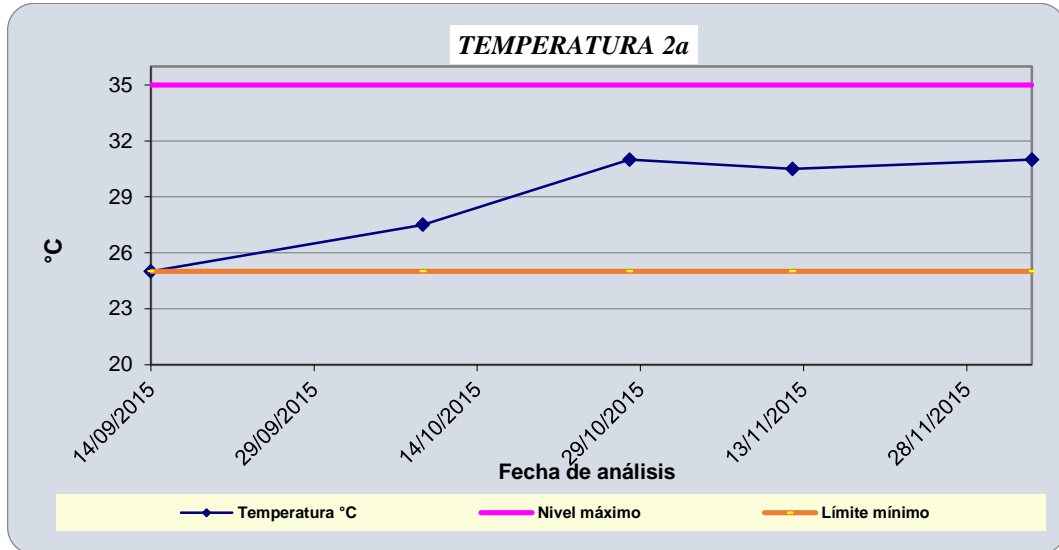


Gráfico 31 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2a.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Humedad debe estar en un rango de 50% a 70% y la caja 2a durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una Humedad promedio de 56%.

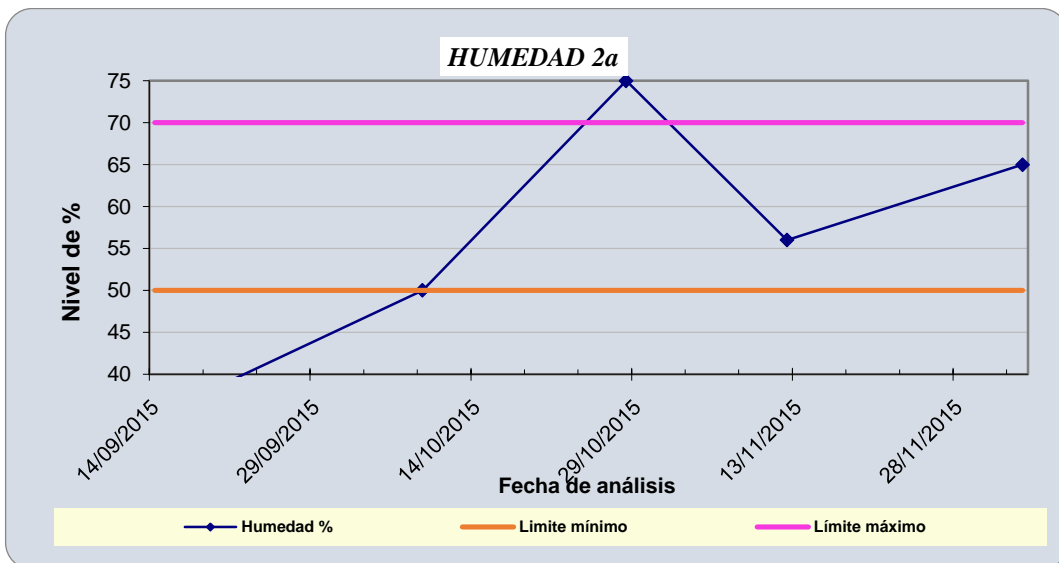


Gráfico 32 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2a.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

Para los TPHs en suelo agrícola su límite permisible debe ser < 2500mg/Kg según la tabla #6 del RAOHE, Decreto Ejecutivo 1215 y la caja 2a durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs de 109000 mg/Kg bajo a 10717 mg/Kg teniendo una eficiencia del 90,2%.

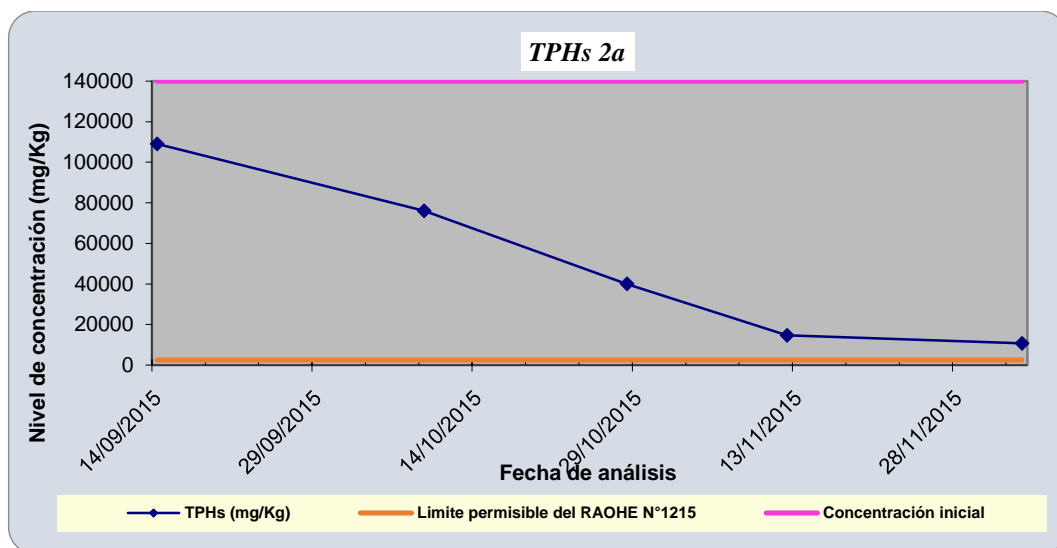


Gráfico 33 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2a.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

4.2.9. Resultados de los análisis de la caja código 2b

Se analizó las variables de control de tratamiento como TPHs, pH, temperatura y humedad durante cuatro meses cuyos resultados de la caja código 2b se presenta en la tabla 12-4, evidenciándose la disminución de los TPHs considerablemente, mientras que las otras variables oscilaban en rangos óptimos de tratamiento.

Tabla 12 – 4: Resultados de los análisis de la caja código 2b

Microorganismo	FECHA	pH	Humedad %	Temperatura °C	TPHs (mg/Kg)
<i>Pseudomona putida</i>	14/09/2015	5,9	45	32	103000
	09/10/2015	6,5	55	29	72000
	28/10/2015	6,8	65	30	32000
EFICIENCIA 90,3	12/11/2015	6,9	45	30	13290
	04/12/2015	6,5	65	30	9944

Límite máx permisible Tabla 6 del RAOHE	5 a 9	Controlada	Controlada	2500
---	-------	------------	------------	------

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

El potencial de hidrógeno (pH) debe estar en un rango de 5 a 9 y la caja 2b durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo dentro del rango establecido. Su valor alto fue 6,90 y el valor más bajo 5,90 el valor promedio es 6,52.

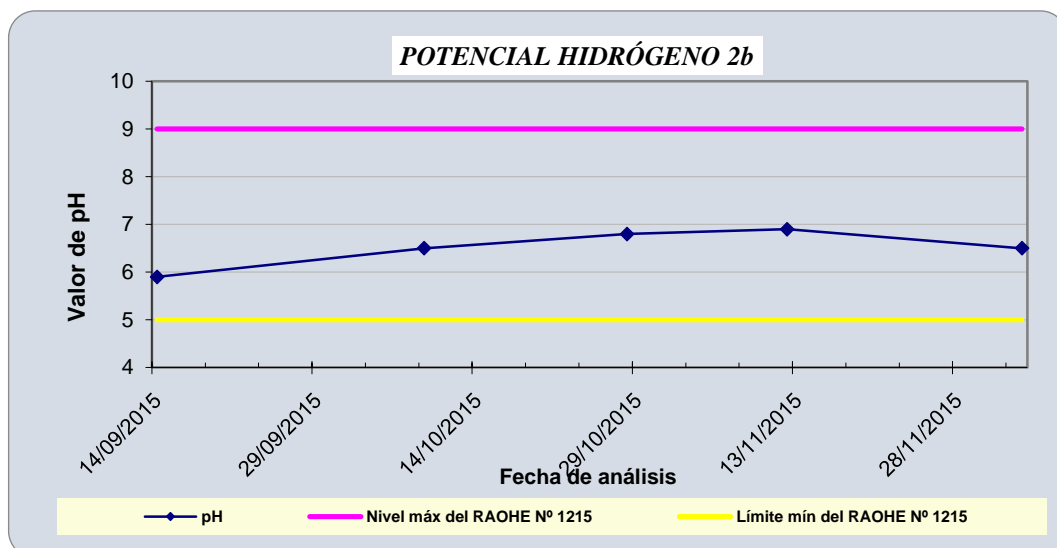


Gráfico 34 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2b.

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

La Temperatura debe estar en un rango de 25°C a 35°C y la caja 2b durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una temperatura promedio 30°C siendo el valor alto 32°C y el más bajo 29°C.

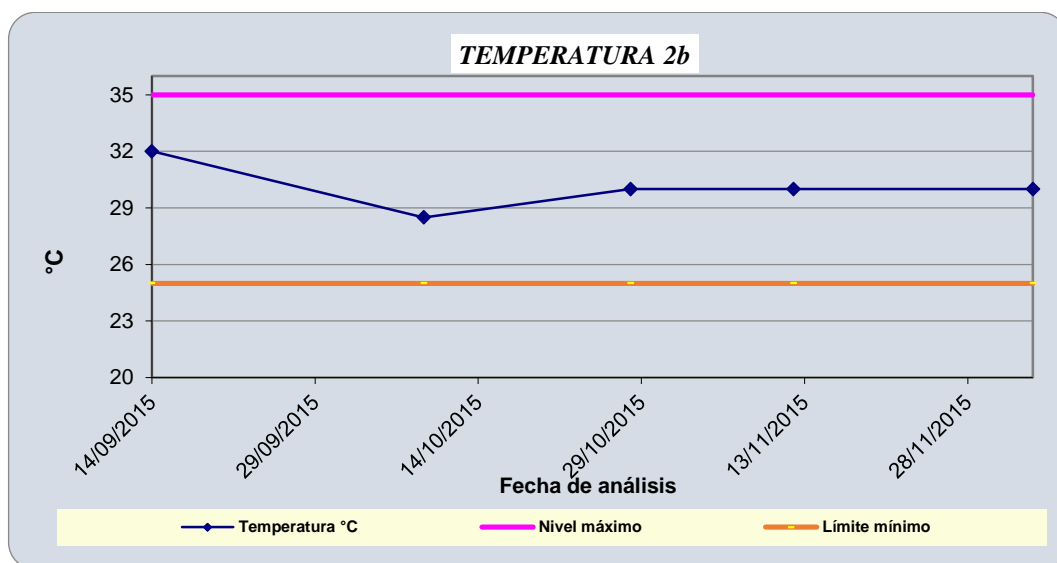


Gráfico 35 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2b.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Humedad debe estar en un rango de 50°C a 70°C y la caja 2b durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una Humedad promedio de 55%.

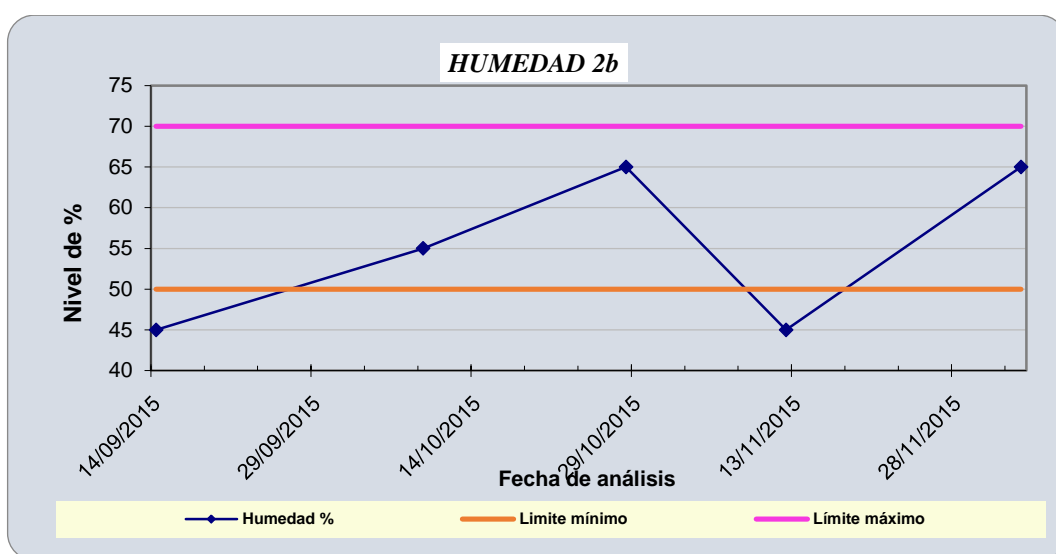


Gráfico 36 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2b.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

Para los TPHs en suelo agrícola su límite permisible debe ser < 2500mg/Kg según la tabla #6 del RAOHE, Decreto Ejecutivo 1215 y la caja 2b durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs de 103000 mg/Kg bajo a 9944 mg/Kg teniendo una eficiencia del 90,3%.

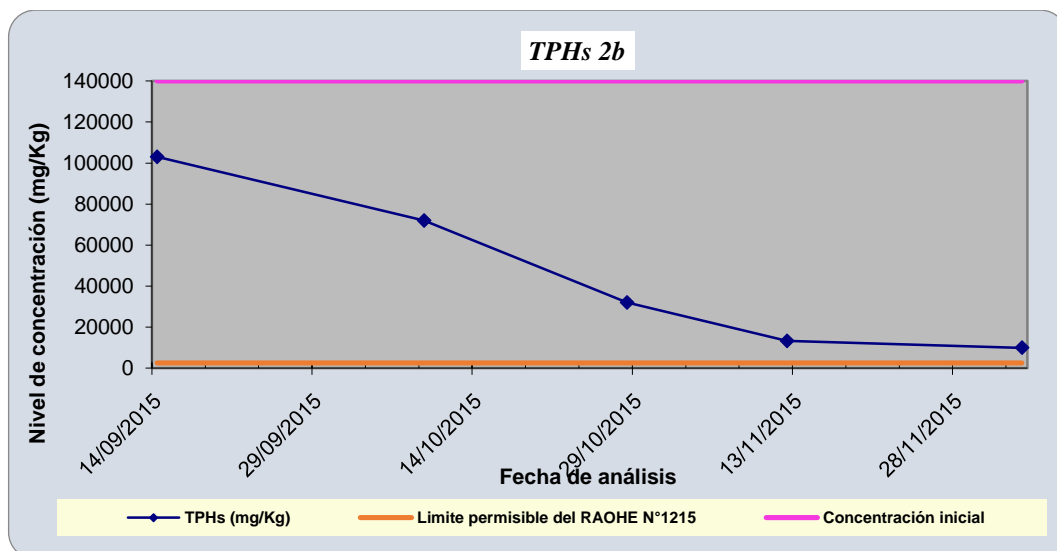


Gráfico 37 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2b.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

4.2.10. Resultados de los análisis de la caja código 2c

Se analizó las variables de control de tratamiento como TPHs, pH, temperatura y humedad durante cuatro meses cuyos resultados de la caja código 2c se presenta en la tabla 13-4, evidenciándose la disminución de los TPHs considerablemente, mientras que las otras variables oscilaban en rangos óptimos de tratamiento.

Tabla 13 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 2c

Microorganismo	FECHA	pH	Humedad %	Temperatura °C	TPHs (mg/Kg)
<i>Pseudomona putida</i>	14/09/2015	6,4	40	28	102000
	09/10/2015	6,7	60	31	78000
	28/10/2015	6,9	68	29	52000
EFICIENCIA 94 %	12/11/2015	7,0	30	29	10390
	04/12/2015	6,7	68	29	6074
Límite máx permisible Tabla 6 del RAOHE		5 a 9	Controlada	Controlada	2500

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

El potencial de hidrógeno (pH) debe estar en un rango de 5 a 9 y la caja 2c durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo dentro del rango establecido. Su valor alto fue 7,0 y el valor más bajo 6,4 el valor promedio es 6,74.

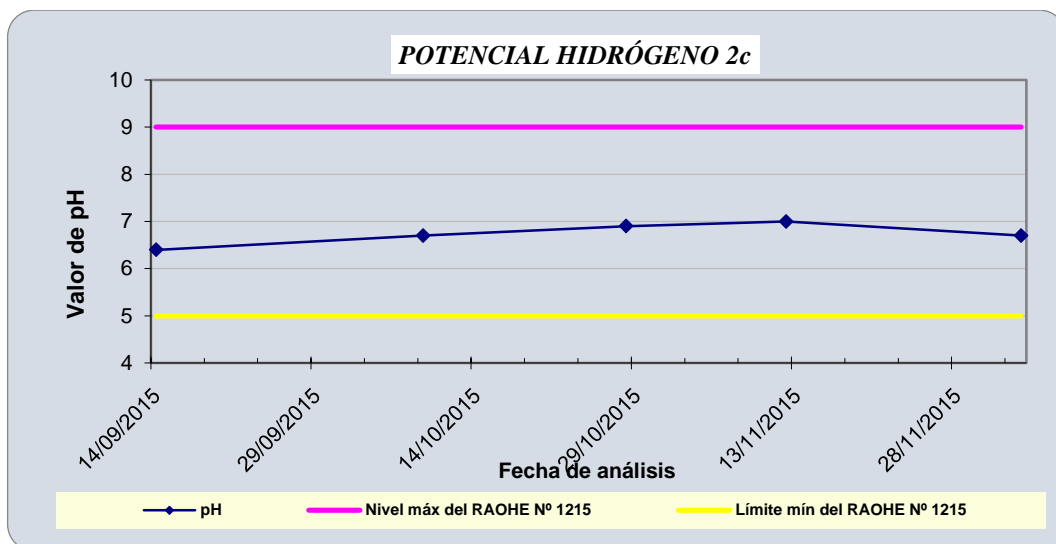


Gráfico 38 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2c.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Temperatura debe estar en un rango de 25°C a 35°C y la caja 2c durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una temperatura promedio 29°C siendo el valor alto 31°C y el más bajo 28°C.

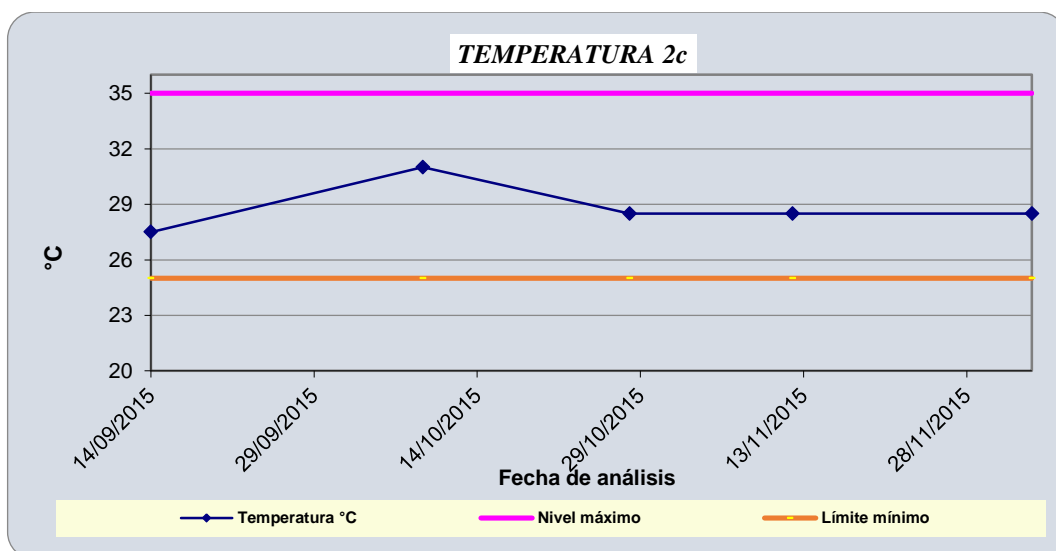


Gráfico 39 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2c.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Humedad debe estar en un rango de 50% a 70% y la caja 2c durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una Humedad promedio de 53%.

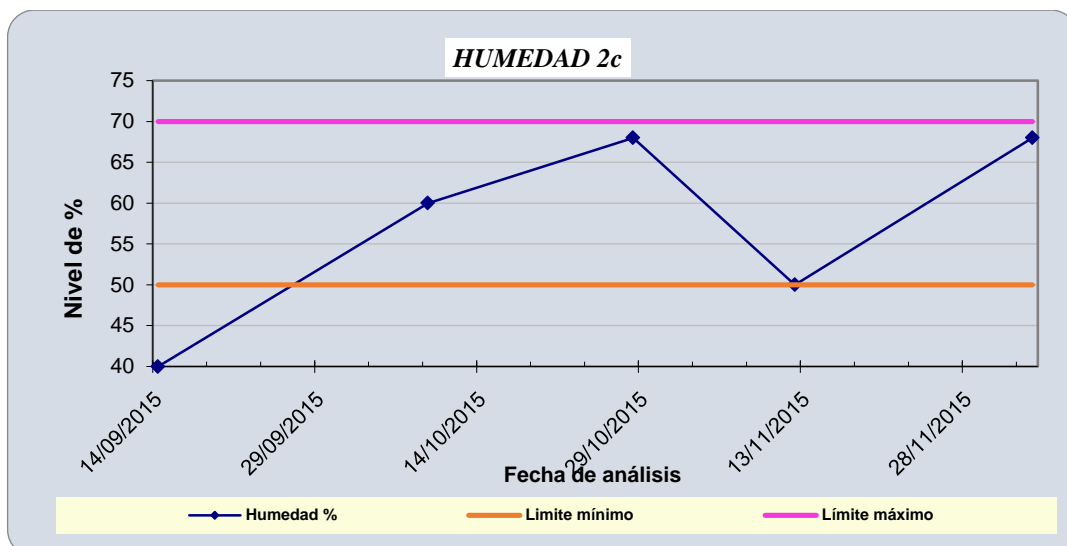


Gráfico 40 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 1d.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

Para los TPHs en suelo agrícola su límite permisible debe ser $< 2500\text{mg/Kg}$ según la tabla #6 del RAOHE, Decreto Ejecutivo 1215 y la caja 2c durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs de 102000 mg/Kg bajo a 6074 mg/Kg teniendo una eficiencia del 94,0%.

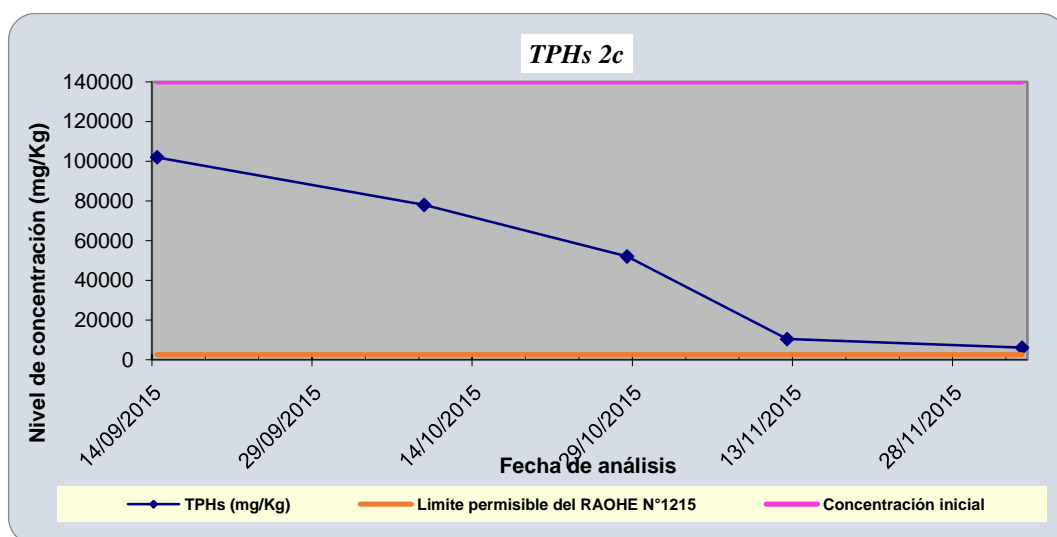


Gráfico 41 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2c.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

4.2.11. Resultados de los análisis de la caja código 2d

Se analizó las variables de control de tratamiento como TPHs, pH, temperatura y humedad durante cuatro meses cuyos resultados de la caja código 2d se presenta en la tabla 14-4, evidenciándose la disminución de los TPHs considerablemente, mientras que las otras variables oscilaban en rangos óptimos de tratamiento.

Tabla 14 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 2d

Microorganismo	FECHA	pH	Humedad %	Temperatura °C	TPHs (mg/Kg)
<i>Pseudomona putida</i>	14/09/2015	6,8	50	29	105000
	09/10/2015	6,1	70	30	61000
	28/10/2015	6,8	65	35	59000
EFICIENCIA 91,3 %	12/11/2015	6,8	45	29	13803
	04/12/2015	6,3	68	35	9128
Límite máx permisible Tabla 6 del RAOHE		5 a 9	Controlada	Controlada	2500

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

El potencial de hidrógeno (pH) debe estar en un rango de 5 a 9 y la caja 2d durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo dentro del rango establecido. Su valor alto fue 6,80 y el valor más bajo 6,10 el valor promedio es 6,56.

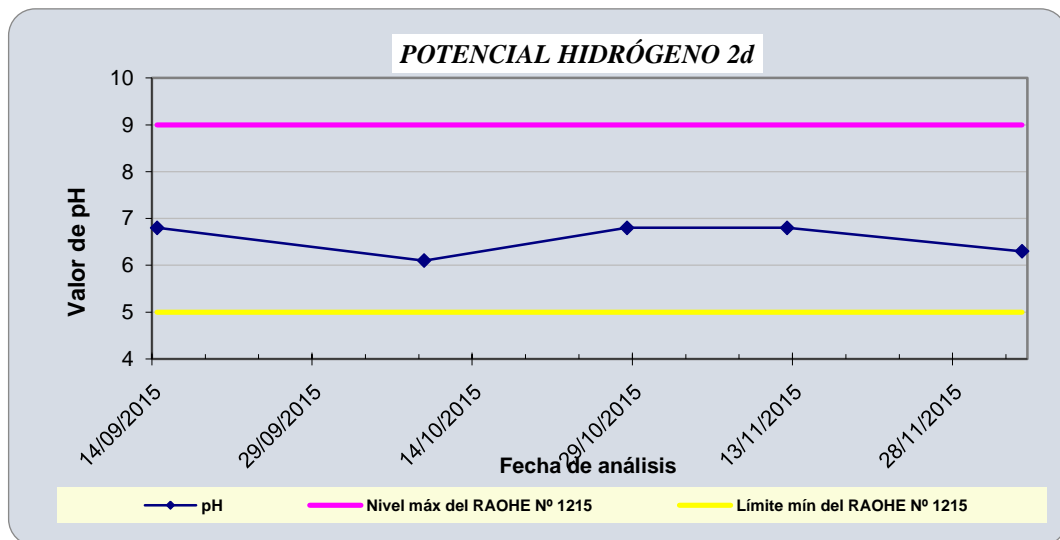


Gráfico 42 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2d.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Temperatura debe estar en un rango de 25°C a 35°C y la caja 2d durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una temperatura promedio 32°C siendo el valor alto 35°C y el más bajo 29°C.

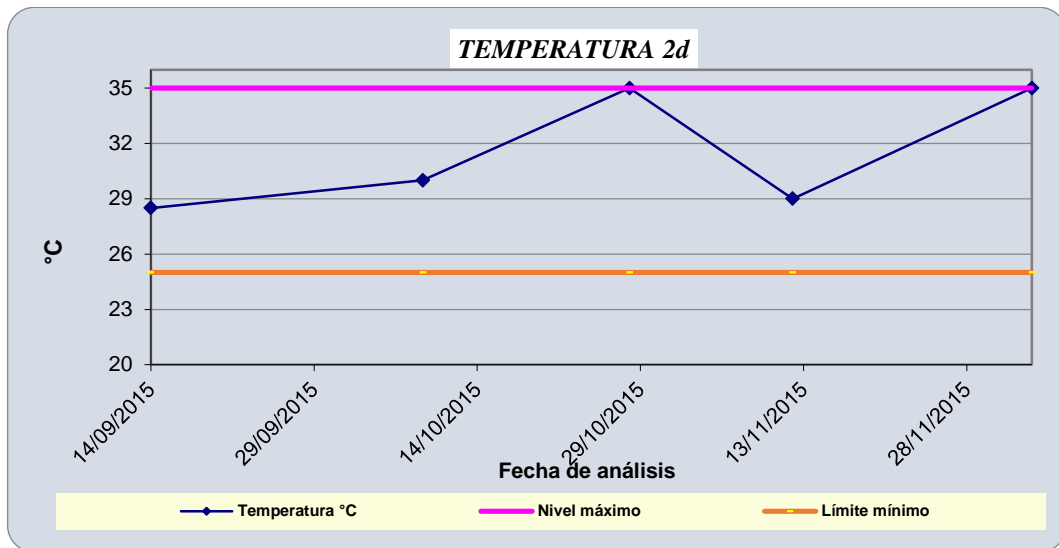


Gráfico 43 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2d.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Humedad debe estar en un rango de 50°C a 70°C y la caja 2d durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una Humedad promedio de 60%.

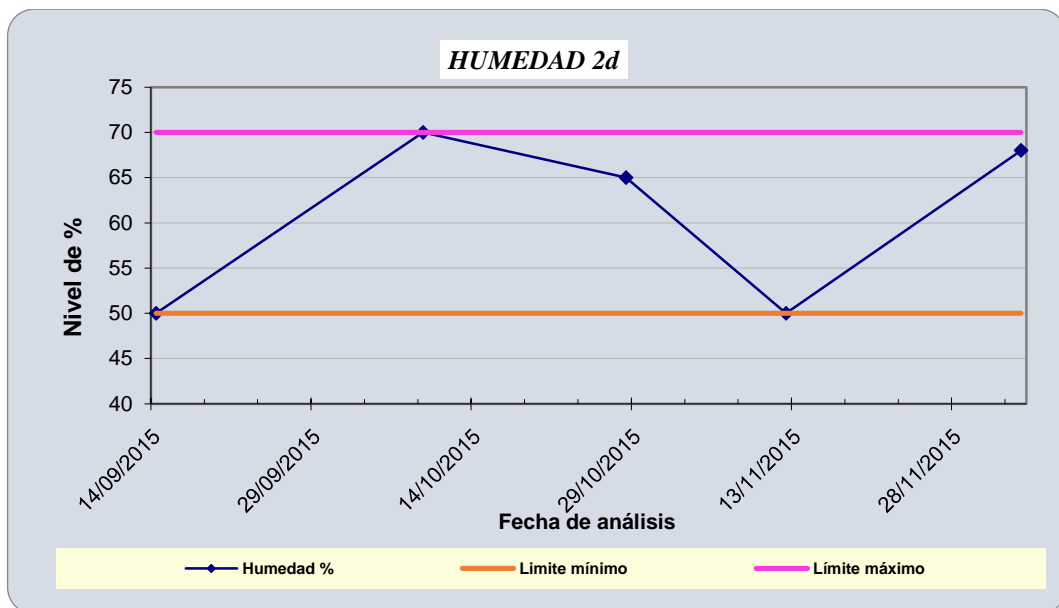


Gráfico 44 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2d.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

Para los TPHs en suelo agrícola su límite permisible debe ser < 2500mg/Kg según la tabla #6 del RAOHE, Decreto Ejecutivo 1215 y la caja 2d durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs de 105000 mg/Kg bajo a 9128 mg/Kg teniendo una eficiencia del 91,3%.

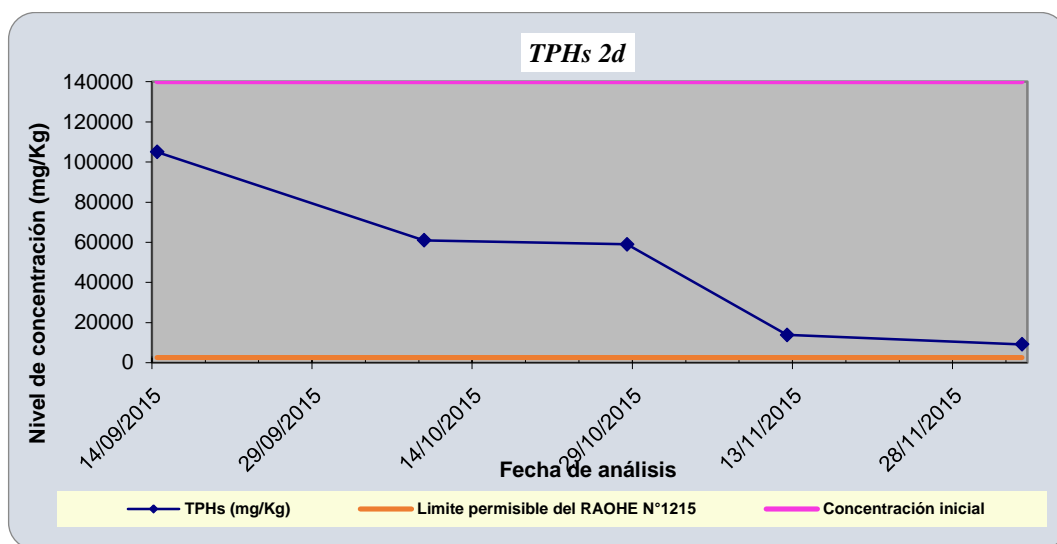


Gráfico 45 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2d.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

4.2.12. Resultados de los análisis de la caja código 2e

Se analizó las variables de control de tratamiento como TPHs, pH, temperatura y humedad durante cuatro meses cuyos resultados de la caja código 2e se presenta en la tabla 15-4, evidenciándose la disminución de los TPHs considerablemente, mientras que las otras variables oscilaban en rangos óptimos de tratamiento.

Tabla 15 - 4: Resultados de los análisis de la caja código 2e

Microorganismo	FECHA	pH	Humedad %	Temperatura °C	TPHs (mg/Kg)
<i>Pseudomona putida</i>	14/09/2015	6,9	40	31	106000
	09/10/2015	6,3	75	29	63000
	28/10/2015	6,9	65	31	32000
EFICIENCIA 89,8 %	12/11/2015	7,0	75	31	13244
	04/12/2015	6,9	65	31	10788
Límite máx permisible Tabla 6 del RAOHE		5 a 9	Controlada	Controlada	2500

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

El potencial de hidrógeno (pH) debe estar en un rango de 5 a 9 y la caja 2e durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo dentro del rango establecido. Su valor más alto fue 7,0 y el valor más bajo 6,3 el valor promedio es 6,8.

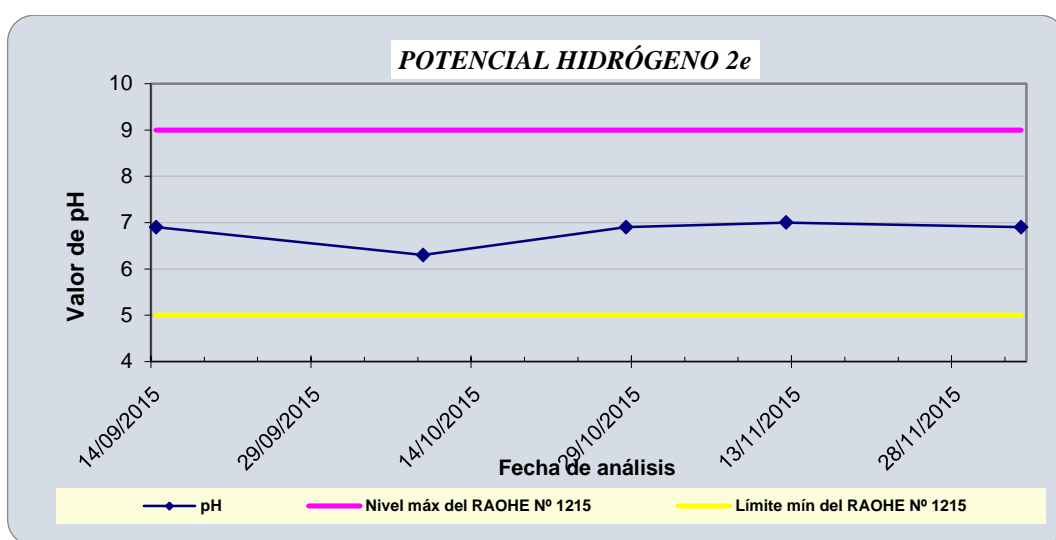


Gráfico 46 - 4: Valores de pH durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2e.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Temperatura debe estar en un rango de 25°C a 35°C y la caja 2e durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una temperatura promedio 31°C siendo el valor más alto 31°C y el más bajo 29°C.

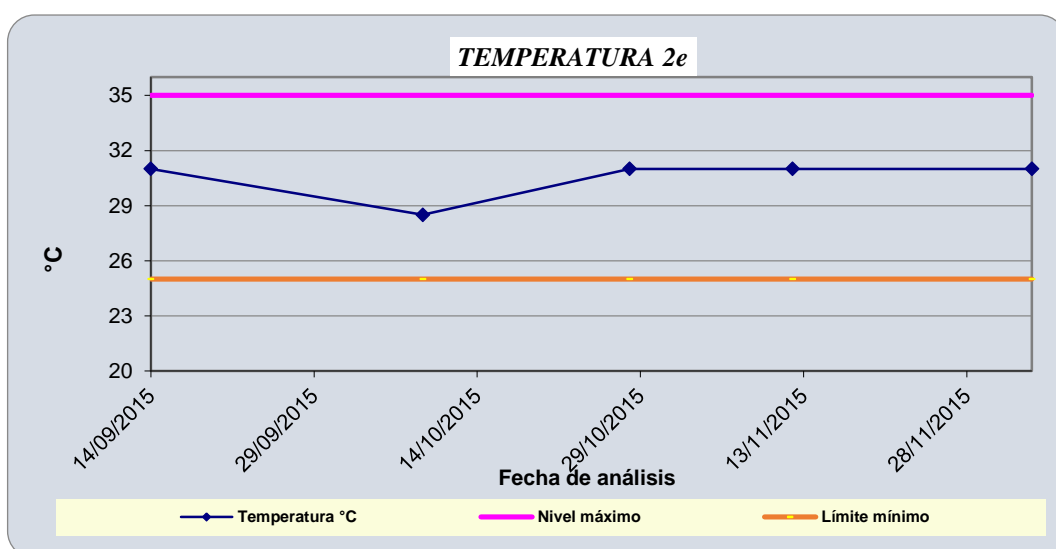


Gráfico 47 - 4: Valores de Temperatura durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2e.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Humedad debe estar en un rango de 50°C a 70°C y la caja 2e durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs estuvo en una Humedad promedio de 64%.

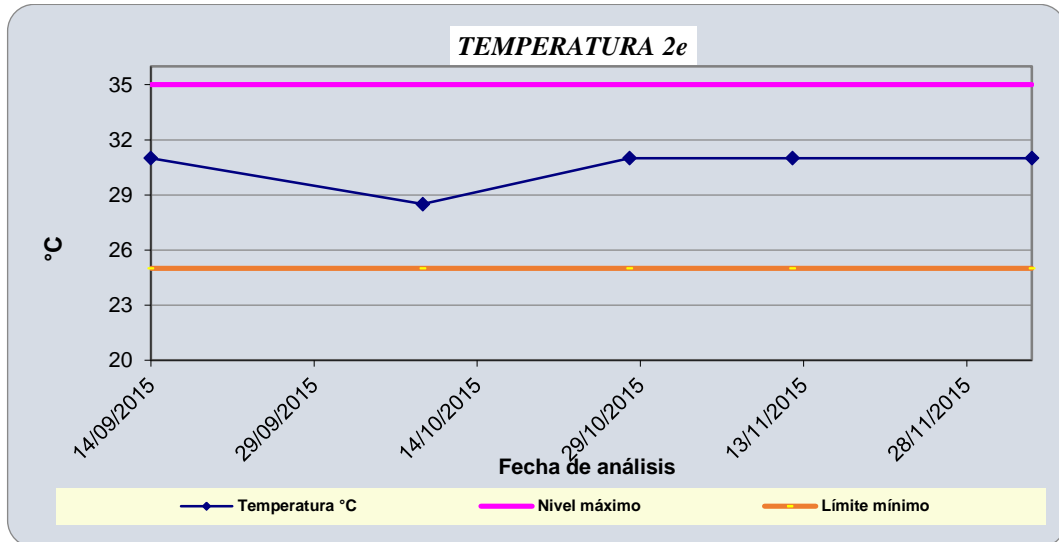


Gráfico 48 - 4: Porcentaje de Humedad durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2e.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

Para los TPHs en suelo agrícola su límite permisible debe ser < 2500mg/Kg según la tabla #6 del RAOHE, Decreto Ejecutivo 1215 y la caja 2e durante el tiempo que se realizó la comparación de eficiencia para degradar TPHs de 106000 mg/Kg bajo a 10788 mg/Kg teniendo una eficiencia del 89,8%.

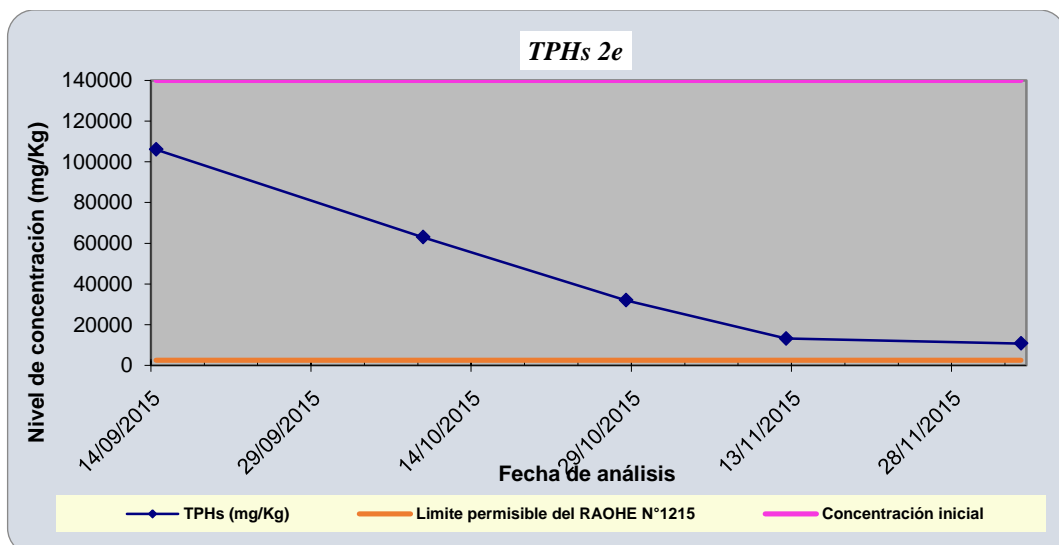


Gráfico 49 - 4: Concentración de TPHs durante la comparación de eficiencia para degradar TPHs de la caja 2e

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

4.2.13. Resultados de los análisis del suelo patrón.

Se analizó las variables de control de tratamiento como TPHs, pH, temperatura y humedad durante seis meses cuyos resultados en el suelo patrón se presenta en la tabla 16-4, evidenciándose la disminución de los TPHs considerablemente, consiguiendo alcanzar la norma de Uso Agrícola del RAOHE, mientras que las otras variables de control oscilaban en rangos óptimos de tratamiento.

Tabla 16 - 4: Resultados de los análisis del suelo patrón

Microorganismo: <i>Pseudomona putida</i>	FECHA	código	pH	Humedad %	Temperatura °C	TPHs (mg/Kg)
	11/07/2015	S.P	6,9	55	30	136000
TÉCNICA DE LANDFARMING	14/09/2015	S.P	6,9	68	29	120000
	09/10/2015	S.P	6,3	58	31	90000
	28/10/2015	S.P	7,0	68	30	80000
	12/11/2015	S.P	6,3	63	29	35000
	04/12/2015	S.P	6,4	60	30	13396
	21/12/2015	S.P	6,7	65	29	10000
	06/02/2016	S.P	7,1	65	35	7000
	EFICIENCIA 98,2%	24/02/2016	S.P	6,9	58	31
08/03/2013		S.P	7,4	65	30	2135
Límite máx permisible Tabla 6 del RAOHE			5 a 9	Controlada	Controlada	2500

Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016.

El potencial de hidrógeno (pH) debe estar en un rango de 5 a 9, durante el tiempo que se aplicó la técnica de Landfarming para degradar TPHs estuvo dentro del rango establecido. Su valor alto fue 7,4 y el valor más bajo 6,3 el valor promedio es 6,79.

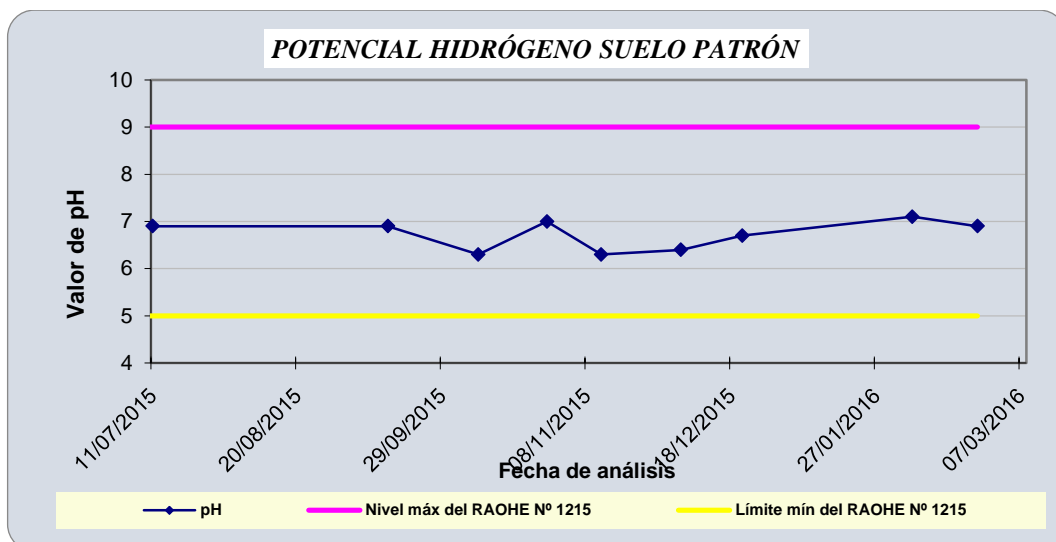


Gráfico 50 - 4: Valores de pH durante la aplicación de la Técnica de Landfarming en el suelo patrón.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Temperatura debe estar en un rango de 25°C a 35°C, durante el tiempo que se aplicó la técnica de Landfarming para degradar TPHs estuvo en una temperatura promedio 30°C siendo el valor más alto 35°C y el más bajo 29°C.

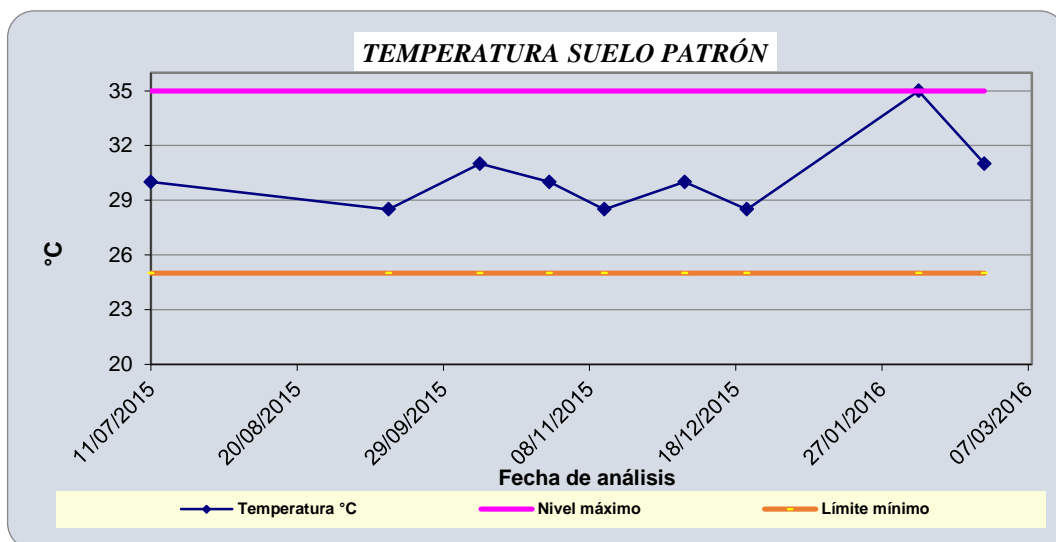


Gráfico 51 - 4: Valores de Temperatura durante la aplicación de la Técnica de Landfarming en el suelo patrón.

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

La Humedad debe estar en un rango de 50% a 70%, durante el tiempo que se aplicó la técnica de Landfarming para degradar TPHs estuvo en una Humedad promedio de 63%.

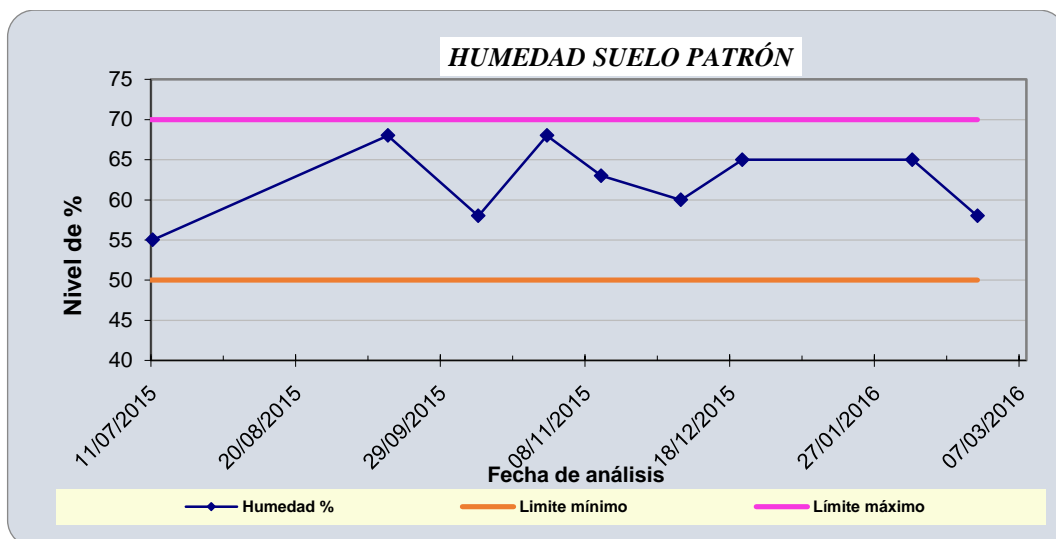


Gráfico 52 - 4: Valores de Humedad durante la aplicación de la Técnica de Landfarming en el suelo patrón.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

Para los TPHs en suelo agrícola su límite permisible debe ser < 2500mg/Kg según la tabla #6 del RAOHE, Decreto Ejecutivo 1215 y durante el tiempo que se aplicó la técnica de Landfarming para degradar TPHs llego a 2135,11 mg/Kg partiendo de 136000 mg/Kg teniendo una eficiencia del 98,24%. Cumplió con el RAOHE para suelo agrícola.

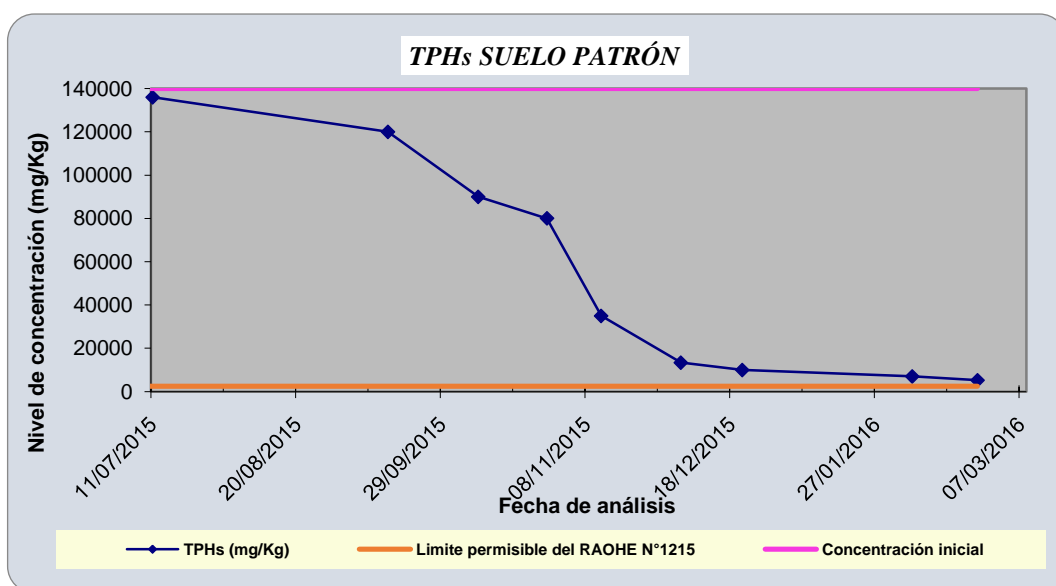


Gráfico 53 - 4: Concentración de TPHs durante la aplicación de la Técnica de Landfarming en el suelo patrón.
Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

4.2.14. Activación de cepas

Se realizó el control de crecimiento microbiano para evaluar la eficiencia del proceso el mismo que se efectuó en tres etapas: inicial, medio y final tal y como lo indica la tabla 17-4 evidenciándose una disminución considerable de UFC durante el tratamiento, debido a que mientras se degradaba el hidrocarburo se agotaba la fuente de carbono y energía de los microorganismos, cesando consigo su desarrollo y sobreviviendo los microorganismos más aptos para la degradación. Se realizó un conteo microbiano con agar selectivo para *Pseudomona* observándose la prevalencia de este género al final del tratamiento.

Tabla 17 - 4: Resultado de Recuento Microbiológico en cajas experimentales

RECUESTO DE MICROORGANISMOS				
MUESTRAS	INICIAL	INTERMEDIO	FINAL	
	Microorganismos totales	<i>Pseudomonas</i>	Microorganismos totales	<i>Pseudomonas</i>
1	2,6exp5	2,2exp4	1,1exp2	5
1a	2,3exp5	3,3exp7	1,4exp3	4,2exp2
1b	2,4exp5	3,5exp7	1,1exp3	4,6exp2
1c	2,2exp5	3,1exp7	1,4exp3	5,0exp2
1d	2,5exp5	3,3exp7	1,2exp3	4,8exp2
1e	2,6exp5	3,4exp7	1,4exp3	5,2exp2
2	2,0exp5	2,3exp4	1,3exp2	4
2a	2,3exp5	3,0exp7	1,3exp3	4,2exp2
2b	2,8exp5	3,3exp7	1,4exp3	4,3exp2
2c	2,5exp5	3,2exp7	1,2exp3	4,0exp2
2d	2,0exp5	3,3exp7	1,3exp3	4,5exp2
2e	2,3exp5	3,0exp7	1,2exp3	4,3exp2

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

4.2.15. Selección de la P. más eficiente.

Por medio de una comparación numérica tal y como lo indica la tabla 18-4 se realizó la comparación de eficiencia entre las cajas experimentales 1 y 2, es decir aquellas en las que no fueron inoculadas con cepas, obteniendo un resultado de eficiencia 88,8% y 87,6% respectivamente.

Tabla 18 - 4: Resultado de eficiencia de las cajas sin cepas

Caja	% eficiencia	Caja	% eficiencia
1	88,8	2	87,6

■ Valor alto ■ Valor bajo

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

En las cajas experimentales inoculadas con cepas de *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona putida* respectivamente tal y como lo detalla la tabla 19-4 mediante la comparación de eficiencia se obtiene en la caja 1a y 2e el porcentaje de eficiencia más bajo con un 89,8%, mientras que el más alto corresponde a la caja 2c con un 94% (inoculada con *Pseudomona putida*).

Tabla 19 - 4: Resultado de eficiencia de las cajas con cepas

Caja	% eficiencia (<i>Pseudomona aeruginosa</i>)	Caja	% eficiencia (<i>Pseudomona putida</i>)
1a	89,8	2a	90,2
1b	93,2	2b	90,3
1c	92,1	2c	94,0
1d	93,1	2d	91,3
1e	92,0	2e	89,8

■ Valor alto ■ Valor bajo

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

4.2.16. Resultados de análisis estadísticos - IBM SPSS:

Por medio de una comparación de medias o Test Student se realizó la comparación estadística mediante IBM SPSS obteniendo los resultados que se proyectan a continuación en la tabla 20-4.

Tabla 60 - 4: Resultado de la comparación

EFICIENCIA1	EFICIENCIA2
90	90
93	90
92	94
93	91
92	90

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

Según la comparación de medias por Test Student da como resultado en la tabla 21-4 que *Pseudomona aeruginosa* es levemente más eficiente que *Pseudomona putida* con una media de eficiencia de 92,04000 frente a un 91,02000 respectivamente; sin embargo, al observar el nivel de significancia de cero se puede concluir que no hay diferencia significativa en las medias, determinando así que se puede elegir cualquiera de las dos para la degradación de TPHs en pasivos ambientales de petróleo.

Tabla 21 -4: Comparación de medias

	Valor de prueba = 0					
	T	Gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
<i>P.aeruginosa</i>	150,381	4	,000	92,04000	90,3407	93,7393
<i>P.putida</i>	112,430	4	,000	91,02000	88,7723	93,2677

Realizado por: Bastidas, J, Cedeño, A, 2016.

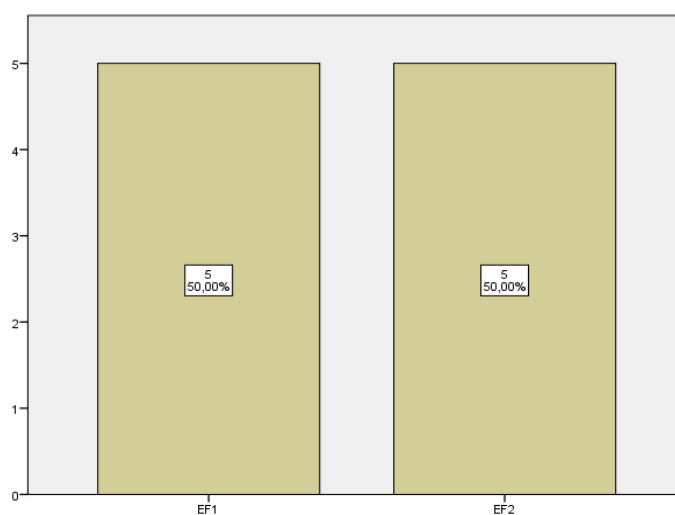
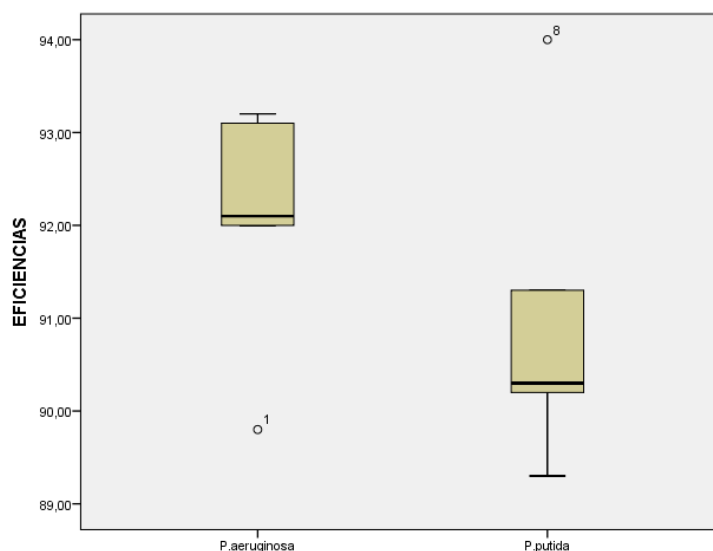


Gráfico 54 - 4: Comparación de eficiencia.
Realizado por: Bastidas J, Cedeño A, 2016

En el gráfico 55-4 en la parte superior podemos observar la dispersión de los porcentajes de eficiencia para la *Pseudomona aeruginosa* que un valor esta fuera de la asimetría siendo un valor muy bajo y para la *Pseudomona putida* de la misma manera se encuentra un número fuera d la asimetría siendo el valor más alto de porcentaje de eficiencia, en la parte inferior podemos ver que la posibilidad de ser eficiente la tiene cualquier bacteria es decir que hay un 50% de ser elegida o no tanto para la *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona putida*.

4.3. Técnica Landfarming

4.3.1. Resultados de los análisis de la relación de nutrientes

De acuerdo a la concentración de fertilizante tanto en Nitrógeno como en Fósforo que contiene el suelo a tratar se debe añadir 0,480 Kg de MAP más 5,31 Kg de Úrea.

4.4. Discusión de Resultados:

De la caracterización físico-química inicial se pudo corroborar que los pasivos ambientales tenían una elevada concentración de TPHs muy por encima de la norma que rige el RAOHE, otros parámetros como la humedad y temperatura fueron relevantes durante el tratamiento ya que al inicio se registró un porcentaje de humedad demasiado alto mientras que la temperatura oscilaba en valores bajos, por lo cual fue beneficiosa la construcción del invernadero para poder manipular y controlar estas variables, observando que al aumentar la temperatura se reducía a rangos óptimos el porcentaje de humedad, para de esta forma dar inicio al proceso de biorremediación con Landfarming.

Con el recuento microbiano se determinó que el suelo patrón tenía bacterias autóctonas dentro de las cuales sobrevivieron aquellas capaces de emplear a los TPHs como fuente de carbono y energía y capaces de sobrevivir a cambios bruscos de temperatura y humedad. Se pudo evidenciar al final del proceso que el número de microorganismos se redujo, y esto era proporcional a la disminución de la concentración de TPHs, de tal manera que era un indicador que la carga contaminante había sido utilizada como sustrato y éste se había agotado.

Fue notable el papel importante que desempeñaron los microorganismos autóctonos en la degradación de los TPHs ya que a las cajas 1 y 2 no se le inoculó *Pseudomona* pero el porcentaje de eficiencia fue 88,8 y 87,6% respectivamente, demostrando así que los mismos ayudaron en el proceso de biorremediación.

Inicialmente el pasivo ambiental tuvo microorganismos autóctonos, posteriormente al inocular las *Pseudomonas* el número de UFC aumentó considerablemente y finalmente al realizar el recuento microbiano fue imprescindible rescatar que *Pseudomona* fue capaz de sobrevivir e interactuar conjuntamente con los microorganismos autóctonos al comprobarse su presencia en agar selectivo.

Las variables de control en la mayor parte del tiempo se mantuvieron dentro del rango óptimo, debido al clima de Puerto Francisco de Orellana era más dificultoso mantener constante la temperatura y el porcentaje de humedad, por tal motivo existió el monitoreo respectivo y constante en el desarrollo de la investigación.

Después de haber monitoreado el proceso se obtuvieron datos valiosos para la comparación de eficiencia de degradación de TPHs por medio de la aplicación de *Pseudomona putida* y *Pseudomona aeruginosa*, aparentemente en porcentaje y si tomamos desde el punto de vista numérico es más eficiente *Pseudomona putida* con el 94%, pero al realizarle la prueba estadística ANOVA y comparación de medias los porcentajes de eficiencia de las 12 cajas experimentales son estadísticamente iguales.

Para la deshidratación del suelo patrón se utilizó aserrín como material de préstamo con la finalidad de acelerar el proceso, al tener una concentración de TPHs de 50000mg/Kg se inició con la técnica de Landfarming siguiendo con los lineamientos recomendados. Se adicionaron también los nutrientes necesarios para el desarrollo y crecimiento de la *Pseudomona putida* en cantidades requeridas de Nitrógeno, Fósforo, Potasio y materia orgánica, llegando a cumplir con los límites permisibles por el RAOHE.

Comparando con la caracterización físico-química inicial, al culminar la fase experimental el porcentaje de degradación de TPHs llegó al 98%, el proceso se facilitó debido a la gran eficiencia de la *Pseudomona putida* permitiéndonos mejorar nuestras expectativas al alcanzar los límites permisibles del RAOHE para suelo agrícola que es de 2135,11mg/Kg, así como también parámetros como Pb, Ni, Cd y HAPs alcanzaron los límites de ecosistemas sensibles.

En el 2004 Alejandra Ávalos y algunos de sus colaboradores en uno de sus estudios concluyeron que al incorporar *Pseudomonas aeruginosa* en un suelo contaminado, esta acelera la biodegradación de hidrocarburos del petróleo en un 61% en tan solo 10 días de incubación. En nuestra investigación al incorporar esta cepa de *Pseudomonas aeruginosa* se alcanzó la eficiencia más baja en la caja 1a de 89,8% y la más alta con 93,1% en la caja 1d durante 10 semanas tratamiento.

Jorge Pardo en el 2004 midió la efectividad de la biolabranza (Landfarming), durante 4 meses, adicionando fertilizantes inorgánicos, obteniendo al finalizar el experimento, un porcentaje de remoción de hidrocarburos del 91%. En nuestra investigación se empleó esta técnica inoculando *Pseudomona putida* durante 6 meses, incorporando a más de fertilizantes inorgánicos (NPK) materia orgánica como residuos vegetales y estiércol, obteniendo una tasa de degradación de TPHs del 98,2%.

Madigan (2007), afirma que la mayoría de los ambientes naturales tienen pH con valores entre 5 y 9, encontrándose la mayor diversidad de microorganismos dentro de los rangos cercanos a la neutralidad, las muestras recolectadas en este estudio se acercan a dichos valores de pH por lo que la supervivencia de los microorganismos autóctonos como el de las *Pseudomonas* es garantizado, obteniendo rangos de pH durante toda la etapa de la biorremediación de 6,9 a 7,4.

CONCLUSIONES:

- La caracterización físico-química y microbiológica del suelo es importante ya que nos permite conocer la concentración inicial de contaminantes del cual partimos para en base a ello establecer el tipo de tratamiento a aplicar y así también conocer que variable se deberá controlar más para el óptimo crecimiento y desarrollo microbiológico.
- *Pseudomona putida* y *Pseudomona aeruginosa* son especies con alto potencial en degradación de agentes contaminantes, excelentes candidatas para la degradación de TPHs, siendo aptas para la aplicación en procesos de biorremediación como es el caso de Landfarming esto debido a que se desarrollan bajo condiciones similares. Cabe resaltar que en la comparación numérica de eficiencia *Pseudomona putida* mostró ser ligeramente más eficiente con una tasa de degradación de 94% por esta razón fue la especie seleccionada a ser masificada e incorporada al suelo patrón.
- El estudio reflejó que al aplicar Landfarming la degradabilidad de la concentración de TPHs aumenta, siendo una fuente apta para incorporar al suelo nitrógeno, fosforo, potasio y carbono que permitieron a los microorganismos desarrollarse y utilizarlos como fuente de carbono y energía acelerando su metabolismo y disminuyendo el tiempo del proceso.
- Según la tabla 6 del RAOHE, para que el suelo tratado pueda tener una adecuada disposición final, la concentración de TPHs no debe superar los 2500 mg/kg de acuerdo a Uso Agrícola, razón más que suficiente para rescatar que la investigación realizada fue exitosa al alcanzar valores de 2135,11 mg/kg encontrándose dentro de la legislación vigente y más aún, superando la expectativa inicial logrando un 98% de degradación de TPHs cuando tan solo se propuso alcanzar un 80 %.
- El protocolo de tratamiento que se entrega al laboratorio auspiciante AqLab facilitará al técnico de campo y laboratorista continuar con el proceso de biorremediación en los pasivos ambientales generados a futuro, beneficiando al mismo ya que le acredita gran responsabilidad con el ambiente al cumplir con la Normativa Ambiental vigente en el país.

RECOMENDACIONES:

- Para próximas investigaciones sería recomendable que la comparación de eficiencia se realice con diferentes géneros de microorganismos o especies totalmente distintas para que los resultados estadísticos sean más diferenciados.
- Para mejorar el porcentaje de eficiencia de masificación a gran escala debería realizarse en un fermentador biológico, bajo condiciones pre-establecidas para cada consorcio o cepa microbiana.
- Buscar materiales sustitutivos al aserrín como puede ser de: palma, caña, maíz, café, cacao, maní en la sustitución del nitrógeno, fosforo y potasio y si es posible realizar una comparación de beneficio en cuanto al mejoramiento de la técnica de Landfarming siendo la prioridad que posea características de mayor abundancia, disponibilidad y bajo costo.
- Se sugiere que el recuento microbiológico se lo realice con mayor frecuencia, para controlar la curva de crecimiento microbiano.
- Recuperar el crudo pesado que contiene el pasivo ambiental a tratar (líquido), para acelerar y mejorar la aplicación de la técnica de biorremediación.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ALEXANDER M.** “*Biodegradation and bioremediation*”. San Diego, United States of American: Academic Press; 1994. Págs: 420-475.
2. **ANDREAS, H., K. KAJ HENRIKSEN, L. MORTENSEN, K. SCOW Y P. MOLDRUP.** Soil physical constraints on intrinsic biodegradation of petroleum vapors in a layered subsurface. "*Vadose Zone Journal*". VOL 9(1). New York (2010). Págs. 137-147.
3. **AMELLAL, N., J. PORTAL Y J. BERTHELIN.** Effect of soil structure on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil. "*Applied Geochemistry*". VOL 16(14): Orleans (2001). Págs. 1611-1619.
4. **ARGENBIO.** El Cuaderno Por qué Biotecnología. Bioremediación. *Bioremediación: organismos que limpian el ambiente*. No 36 (2004). New York. [Consulta: 30 de noviembre 2015]. Disponible en: [http:// www.porquebiotecnologia.com.ar](http://www.porquebiotecnologia.com.ar).
5. **ATLAS RM.** “Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective”. *Microbiol Rev.* 45(1): New York (1981); Págs. 180–209.
6. **BAKER KH.** “*Bioremediation of surface and subsurface soils*”. New York: McGraw-Hill; 1994. Págs. 17-29.
7. **BALBA, M., AL-AWADHI, N., & AL-DAHER, R.** “Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assesment and fild evaluation”. *Journal of Microbiological Methods*, Vol.32 (1998), United State of America) Págs.155-164.
8. **BELLIDO F, MARTIN NL, ET AL.** *Revaluation,using extract cells,of the exclusión limit and role of porin. OprF in Pseudomonas aeruginosa outer membrane permeability. J bacteriol Spain.* 1992: 174: Págs: 5196-5026.
9. **BRAIBÁNT CAROLINE.** *Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por Acinetobacter sp. Y Pseudomonas putida para su aplicación en la biorremediación de*

suelos contaminados.(Tesis) (Ingeniería en biotecnología) INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA Cartago, Costa Rica. 2004 Págs.: 18-25.

10. **BRENNER DJ, STALEY JT, KRIEG NR.** *Classification of procaryotic organisms and the concept of bacterial speciation.* “*Manual of Systematic Bacteriology*”. 2º Ed. New York- United States of America. Bergey´s- Springer Verlag, 2001;1. Págs: 27-31.
11. **CASELLAS M., GRIFOLL M., SABATE J., SOLANAS A. M.** “Isolation and characterization of a 9- fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium”. *Can J Microbiol.* Vol.: 44 (1998); Págs.: 734-742.
12. **COHEN, S. & CREAGER, M.** “Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses”. *Treatment and disposal of pesticides waste.* R.F. Krueger and J.N. Seiber (Eds). American Chemical Society, Washington,D.C. 1984.
13. **DIBBLE J.T, & BARTHA R.** “Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge”. *Appl Environ Microbiol.*Vol: 37. Los Ángeles (1979): Págs.: 729-739.
14. **ECUAMBIENTE CONSULTING GROUP.** Definición y Verificación de Pasivos Ambientales, Consultoría Ambiental. Quito, Ecuador. 2001. Disponible en: <http://www.ecuambiente.com>.
15. **EPA,** “Volatile Orgaic Compouds (VOC´s)”, (London, 2011). Disponible en: <http://www.epa.gov/iaq/voc.html>.
16. **ERCOLI E, GÁLVEZ J, DI PAOLA M, CANTERO J, VIDELA S, MEDAURA M, BAUZÁ J.** “Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de

hidrocarburos en suelo". [blog]. [Consulta: 27 de noviembre de 2015]. Disponible en:
[http:// www.eduardoercoli.com.ar/publicaciones/Param_criticos.pdf](http://www.eduardoercoli.com.ar/publicaciones/Param_criticos.pdf).

17. **EWEINS J. et al.** "Principios de la biorrecuperación." *Biorremediación*. Madrid (España). Ed.McGraw-Hill, 1999.p.25-37.
18. **GARCÍA E.A & GERRERO I.L.** *Pseudomonas* en Biotecnología." *BioTecnology*" .Vol. 9, N° 1. 2000 (México DF). Págs. 26-37.
19. **GÓMEZ S.E; GUTIÉRREZ D.C ET AL.** Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. "*Biotechnology Environmental -NOVA - PUBLICACIÓN CIENTÍFICA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS. VOL.6 No. 9 - ISSN: 1794-2470. Enero de 2008. Págs. 101-212*
20. **GONZÁLEZ R, MONROY M, MIER MV.** "Estudio de biorremediación de suelos contaminados con Tetracloroetileno". *En: XXXVI Congreso Mexicano de Química. México Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco: Sociedad Química de México, A.C; 2001. Págs. 225-230.*
21. **HAIGLER BE, PETTIGREW CA, SPPAIN JC.** "Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* strain JS150". *Appl Environ Microbiol.* Vol.: 58. New York (1992). ; Págs.: 2237–2244.
22. **HAMBRICK GA, DELAUNE RD, PATRICK WH.** "Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation". *Appl Environ Microbiol.* San Diego-EE.UU (1980). Vol.: 40. Págs: 365-369.
23. **HARAYAMA,S; H,KASAI; K,SHUTSUBO.** "Petroleum biodegradation in marine environment". *Journal of Molecualr Microbiology and Biotecnology.*181(1999). Págs: 63-70.
24. **HOLDEN PA & HALYERSON LJ.** Efectos del estrés de agua en la biodegradación de tolueno por *Pseudomonas putida*. *Biodegradación* 1997 (Madrid- España), 8: Págs.: 143 a 51.

25. **JORGE, Q. L.** “*Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo*”. Madrid-España. Nova. (2006). Págs: 123-215.

26. **JOYNT, J., et al.** Microbial Community Analysis of Soils Contaminated with Lead, Chromium and Petroleum Hydrocarbons. *Microbial Ecology*. (2006). New York. Págs. 243-260.

27. **KERRY E.** “Microorganism colonizing plants and soil subjected to different degrees of human activity, including petroleum contamination in the Vestfold Hills and MacRobertson Land Antarctica”. *Polar Biol.* Vol.10. Antártica (1990); Págs.423-430.

28. **KINCANNON, CB.** “Oily waste disposal by soil cultivation process”. [Blog] . [Consulta: 30 de noviembre de 2015]. Disponible en: <http://www.amazon.com/disposal-cultivationEnvironmental-protection-technology.html>.

29. **KRIEG NR, HOLT JG. BERGEY’S** Manual of Sistematic Bacteriology. Ed. Williams y Wilkings. Baltimor, U.S.A. 1984; 1:141–199.

30. **LEAHY JG & COLWELL RR.** “Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment”. *Microbiol Mol Biol Rev.* New York. Vol.: 54(1990). Págs.305-315.

31. **LEPO, J.; HANCOCK, P.; ZULEGER, C.; ROUPP-EDWARDS, K.** Effectiveness and safety of biosurfactants as agents of oil spill response. *Center for Environmental Diagnostics and Bioremediation, University of West Florida.* Pensacola (2001). Estados Unidos. (Consulta 10 de diciembre del 2015). Disponible en: <http://www.kmprc.or.kr/dataroom/2001iosc/PDF/00609.pdf>. 33

32. **LIU , W., LUO, Y., TENG, Y., LI, Z., & MA, L.** Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes. *Environment Geochemistry and Health, Vol. 32* (2010). Págs. 23-29.

33. **MAILA, M., & CLOETE, T.** Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages? *Reviews in Environmental Science & Biotechnology, Vol 3*(2004), London. Págs. 349-360.

34. **MAROTO ME, & ROGEL JM.** “Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y Aguas contaminadas por hidrocarburos”. *MMWR* Madrid-España (2002). Disponible en: <http://aguas.igme.es/igme/publica/pdflib15/028.pdf>.
35. **MEYER JM, et al LEMANCEAU.** Siderophore typing a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. *Appl Environ.* Vol 68. 2002(USA). Págs. 2745- 2753.
36. **MOLINA L, UDANDO Z, Et al.** *Pseudomona putida* Strain Isolated from a Hospital. “*PLoS ONE*”. 2014 (Berlín-Germany). 127 (2). Págs. 425-460. (Consulta: 20 de noviembre de 2015) Disponible en: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0081604>>.
37. **MORENO, M. et al,** Tratamiento de suelos contaminados con hongos. Santiago de Chile (2004). Pág 4.
38. **MORRINSON AJ JR & WENZEL RP.** Epidemiology infections due to *Pseudomonas Aeruginosa.* USA, 1984; 6 (Suppl.3): Págs.: 627-642.
39. **MOLINA L, UDANDO Z, Et al.** *Pseudomona putida* Strain Isolated from a Hospital. “*PLoS ONE*”. 2014 (Berlín-Germany). 127 (2). Págs. 425-460. (Consulta: 20 de noviembre de 2015) Disponible en: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0081604>>
40. **MUKHERJEE, A., & BORDOLOI, N.** Bioremediation and reclamation of soil contaminated with petroleum oil hydrocarbons by exogenously seeded bacterial consortium: a pilot-scale study. *Environment Science and Pollutant Research, Vol 18,* New York (2011). Págs.471-478.
41. **NOMACK, M.** “Environmental impacts of oil spills”. “*The Encyclopedia of Earth*”.(En línea). 2010 (USA). VOL (28). Págs. 25-33. [Consulta: 20 de noviembre 2015]. [http://www.eoearth.org/view/article/158443/\(2010\)](http://www.eoearth.org/view/article/158443/(2010)).

42. **ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** *Introducción a la toxicología ambiental*. México: Editora Lilia Albert. (1999). Págs.37-40.
43. **PALIWAL, V., PURANIK, S., & PUROHIT, H**Integrated Perspective for Effective Bioremediation. "*Applied Biochemistry and Biotechnology*", Vol . (2012). New York. Págs.166, 903-924.
44. **PALLERONI NJ.** "Pseudomonas". *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* .2 ° ed. 2005(New York). 2:323-379).
45. **PARDO JL, PERDOMO MC, BENAVIDES JL.** "Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo". *NOVA*. Vol.: 2 (2004). Págs.:40-49.
46. **PELLERONI, NJ.** "A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria.". "Pseudomonas classification". *Antonie van Leeuwenhoek* 64, 1993. Págs. 231-251.
47. **PELLINI A.** "*Biorremediación estimulada por efluentes cloacales tratados de suelos contaminados con hidrocarburos*".[Blog]. [Consulta: 27 de noviembre de 2015] Disponible en: <http://www.tesis.bioetica.org/lp.htm>
48. **PETROECUADOR.** Masificación de consorcios microbianos. "*Manual para la Remediación de suelos contaminados*". Quito (2005). Págs. 33-34.
49. **POLLACK, M.** *Pseudomonas aeruginosa*. In. *Mandell GL*. Vol. 65. New York- EE.UU. (2000) Págs. 1980-2003).

50. **PRINCE, R. ; VARADARAJ, R. ; FIOCCO, R. ; LESSARD, R..** Bioremediation as an oil spill response tool. *Environmental Technology*. “*Environmental Technology*”vol 20. (1999), (United State of America). Págs: .891-896.
51. **PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADÁ.** “*Pseudomonas spp, Pathogen Safety data sheet-Infectious Substances*”, 2° Ed. Canadá. 2015. Disponible en: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/pseudomonas-spp-eng.php>>.
52. **PUCCI GN, HÄRTIG C, PUCCI OH.** “Influence of salinity and temperature on fatty acid composition of *Pseudomonas fluorescens* GNP-OHP-3 membrane”. *Rev Argent Microbiol*. Vol: 36. New York (2004). Págs.: 6-15
53. **RATAJCZAK, A; & GEIBDÔRFER.** 1998. *Alkane hydroxylase from Acinetobacter sp. Strain ADP1 is encoded by alkM and belongs to a new family of bacterial integral-membrane hydrocarbon hydroxylases*. 4° Ed. London-England. Debate, 1998. Págs: 1175-1179.
54. **RON JOSÉ.** *Organismos degradadores de petróleo. Degradación de Hidrocarburos*. New York-EE.UU : s.n., 2009, págs. 209-230.
55. **RUIZ LIDIA.** *Pseudomona aeruginosa*, aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos.(Tesis) (Maestria) Universidad de Barcelona. Facultad de Medicina-Escuela de Microbiología. Barcelona-España, noviembre 2007. Págs: 22-62. Disponible en: http://www.eduardoercoli.com.ar/publicaciones/Param_criticos.pdf
56. **SAYLER, G.S. & HOOPER S.W.** “Catabolic plasmids of enviromental and ecological significance”. *Microbial Ecology*. 19 (1990). USA. Págs: 1-20.

57. **SINGER, M & W.R. FINNERTY.** “Petroleum Microbiology”. “*R.M ATLAS*”. 75(1984). USA. Págs.: 99-106.
58. **STAUNTON S.** “Effect of pH and some organic anions on the solubility of soil phosphphate: implications for P bioavailability”. *Eur J Soil Sci.* London (1996). Vol.: 47. Págs.231–239.
59. **THAPA, B., KUMAR, A., & GHIMIRE, A.**”Review on Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants in Soil”. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, Vol 8(1).(United States of America).2012. Págs. 164-170.
60. **UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA,** Contaminación por hidrocarburos en la zona costera de la ciudad de Antofagasta. Chile (2005). Pág. 3.
61. **US-EPA,** “Biorremediación y tratamiento de efluentes, (*Hidrocarburos Aromáticos*)”, Madrid, 2003. Disponible en:
<http://www.revistaciecias.com/publicaciones/epzpulFkAZqbeLielissfm.php>.
62. **VENOSA, A; STEPHEN,J. ;MACNAUGHTION,S. ; CHANG, Y. ;WHITE, D** *Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill..* 25-38, Canada : Halifax., 1999, Microbial Biosystems, Vol. 289, Págs. 25-33.
63. **VIÑAS CANALS MARC.** “Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos”. *Caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica.* [Tesis Doctoral]. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2005. Págs.: 45-87. Disponible en:
http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2396/tesis_mvinas_canals.pdf?sequence=1

64. **VOLKE T, & VELASCO J.** “Biodegradación de hidrocarburos del petróleo en suelos intemperizados mediante composteo”. [Blog]. [Consulta: 02 de diciembre de 2015] Disponible en: [http:// www.ine.gob.mx/dgcnica/descargas/composteo2003.pdf](http://www.ine.gob.mx/dgcnica/descargas/composteo2003.pdf).
65. **ZHONGQI H, & SPPAIN J.** “Studies of the catabolic pathway of degradation of nitrobenzene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45: Removal of the Amino Group from 2-Aminomuconic Semialdehyde”. *Appl Environ Microbiol.* Vol: 63. New York (1997). Págs.: 4839–4843.

ANEXOS

ANEXO A: Aval dirigido desde Dirección de Escuela al Laboratorio AqLab



ESPOCH

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

DEPENDENCIA: ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Of. N.701.ECQ.FC.ESPOCH.15
Riobamba, 28 de julio de 2015

Ingeniero
Armando Meléndrez
DIRECTOR TÉCNICO DE AQ-LAB
Presente.-

De mi consideración:

Reciba un atento saludo a nombre de la escuela de Ciencias Químicas de la ESPOCH, a la vez me dirijo a usted para solicitarle comedidamente se facilite el ingreso al laboratorio y la información necesaria para la realización del Trabajo de Titulación como tema: " **COMPARACIÓN DE EFICIENCIA ENTRE Pseudomona aeruginosa y Pseudomona putida, Y SU MASIFICACIÓN PARA LA REMEDIACIÓN DE TPHs EN LOS PASIVOS AMBIENTALES DE AQ-LAB EN PUERTO FRANCISCO DE ORELLANA, 2015** " a las señoritas: **ADRIANA ELIZABETH CEDEÑO RUBIANO** y **JOHANNA ALEXANDRA BASTIDAS RIVADENEIRA**, estudiantes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental

Por la atención prestada expreso mi agradecimiento y me suscribo.

Atentamente,

Ing. María Fernanda Rivera

DIRECTORA ESCUELA CIENCIAS QUÍMICAS - ESPOCH. (E)

31 JUL. 2015

Recibido

Hora: 11:00 h.

Responsable:

Armando Meléndrez

Margoth T

ANEXO B: Resultados de análisis físico-químicos de los residuos de fondos de tanque



Laboratorio de ensayo
acreditado por el OAE con
acreditación
Nº OAE LE C 14-009

INFORME DE ENSAYO Nº: 2370

ESPOCH

SAS: 15-120

Solicitado por: Srta. Johanna Bastidas.
Dirección: Tesista.

Fecha y hora de ingreso al laboratorio:	2015/07/11 17:00	Fecha final de Análisis	2015/07/16	T máx: 31°C T mín: 21°C
Toma de muestra:	Srta. Adriana Cedeño	Fecha y Hora	2015/07/11	17:00

Código de Muestra: s 0413

Identificación: Suelo contaminado, Residuos de suelos contaminados, Generados por el Laboratorio AQLAB.

Parámetros, métodos y resultados:

Parámetros	Método de Ensayo	Referencia	Uso Agrícola ²⁾	Uso Industrial ³⁾	Ecosistemas Sensibles ⁴⁾	Unidad ¹⁾	s 0413	Incertidumbre (K = 2)
*Níquel	ITE-AQLAB-43	SM 3030 B, 3111 B	< 50	< 100	< 40	mg/Kg	60,37	~
*Plomo	ITE-AQLAB-45	SM 3030 B, 3111 B	< 100	< 500	< 80	mg/Kg	146,8	~
*Cadmio	ITE-AQLAB-34	SM 3030 B, 3111 B	< 2	< 10	< 1	mg/Kg	1,81	~
*Hidrocarburos totales	ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	< 1 000	mg/Kg	132 630,66	~
*Hidrocarburos aromáticos	ITE-AQLAB-55	EPA 8310, 3510 C, 3630 C	< 2	< 5	< 1	mg/Kg	3,99	~

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 Meléndez Lara
DIRECTOR TÉCNICO

Francisco de Orellana, 16 de julio de 2015

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

ANEXO C: Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas del Ecuador, RAOHE, Decreto Ejecutivo 1215.

Tabla 6.

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

Los límites permisibles a aplicarse en un proyecto determinado dependen del uso posterior a darse al suelo remediado, el cual constará en el respectivo Programa o Proyecto de Remediación aprobado por la Subsecretaría de Protección Ambiental.

De presentar los suelos naturales (no contaminados) del área concentraciones superiores a los límites establecidos, se pueden incrementar los valores del respectivo parámetro hasta este nivel, siempre que se haya comprobado este fenómeno estadísticamente a través de un monitoreo de suelos no perturbados ni influenciados en el mismo área.

El monitoreo consistirá de una caracterización inicial del sitio y/o material a remediarse, un monitoreo de por lo menos un muestreo con los respectivos análisis cada seis meses, y una caracterización final una vez concluidos los trabajos. Dependiendo de la tecnología de remediación aplicada, la frecuencia del monitoreo será mayor, conforme al Programa o Proyecto de Remediación aprobado por la Subsecretaría de Protección Ambiental

Parámetro	Expresado en	Unidad ¹⁾	Uso agrícola ²⁾	Uso industrial ³⁾	Ecosistemas sensibles ⁴⁾
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

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 (construcciones, 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.

ANEXO D: Construcción del invernadero

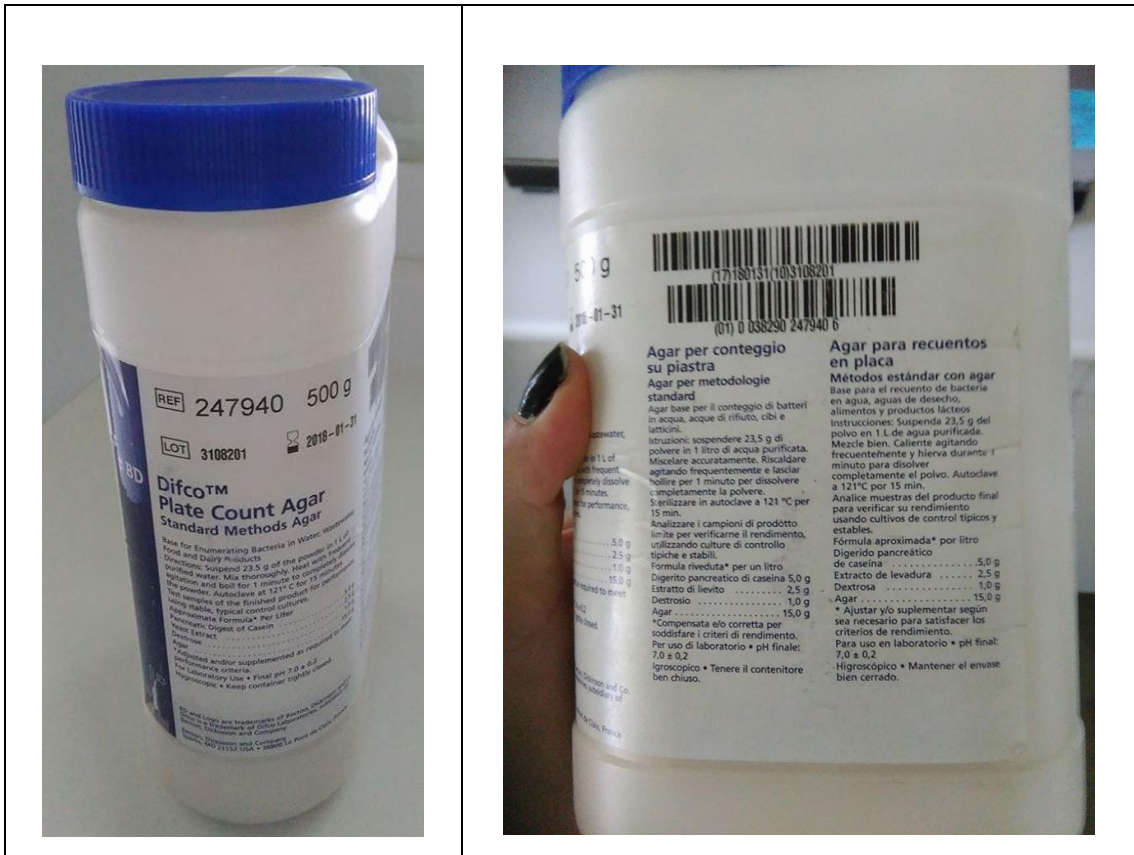


ANEXO E: Cepas

1. PREPARACIÓN DEL AGAR PCA

Procedimiento: (Plate Count Agar)

- Suspenda 23,5g del polvo en 1 L de agua destilada.
- Mezcle bien.
- Caliente agitando y hierva durante 1 min para disolver completamente el polvo.
- Autoclave a 121°C por 15 min.



2. PREPARACIÓN DEL AGUA DE PEPTONA

Procedimiento:

- Suspenda 2,55 g del polvo en 1 L de agua destilada.
- Mezcle bien.
- Caliente agitando y hierva durante 1 min para disolver completamente el polvo.
- Autoclave a 121°C por 15 min.

3. MÉTODO 1

- Method 1: Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar), nonselective Sheep Blood Agar, Standard Methods Agar (Plate Count Agar) or Nutrient Agar – 35°C in aerobic atmosphere -24 to 48 hours.

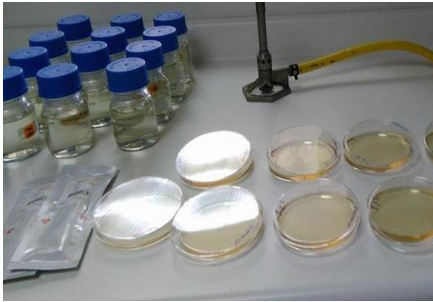
4. ACTIVACIÓN DE CEPA



PASO 1: Kiwt stik de *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona putida*.



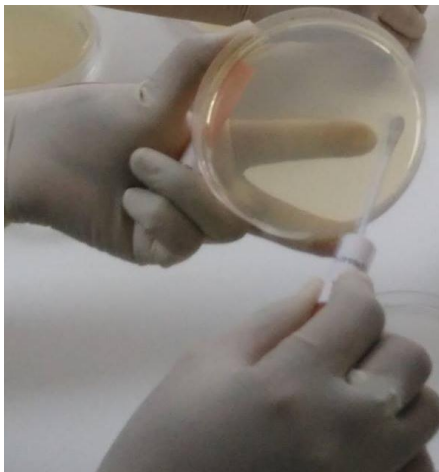
PASO 2: Se preparó el agar y se colocó en las cajas Petri



PASO 3: Solidificación del agar en las cajas Petri



PASO 4: Se rompe una capsula y baja el líquido enriquecido que contiene las bacterias



PASO 5: Se siembra las bacterias con el hisopo

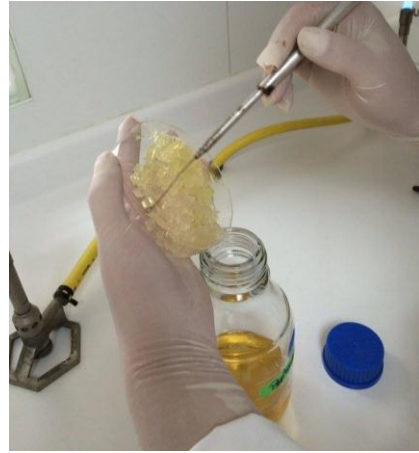


PASO 6: Se realiza frotis para sembrar las bacterias

5. MASIFICACIÓN DE *Pseudomona putida*



PASO 1: Lugar de trabajo aséptico



PASO 2: Los pequeños cuadritos de agar con la *Pseudomona putida* se colocaron en el agua de peptona



PASO 3: Se conserva 24h el agua de peptona con la bacteria y con gotas de crudo

6. CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS DE *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona putida* (CRIOBIALES)

- Después de 24 horas.
- Tomar 24 tubos tapa rosca capaces de contener 10 mL.
- Añadir 3 mL de agua desmineralizada y 3 mL de leche descremada UHT.
- Autoclave a 121°C por 15 min.
- Dejar que se enfríen.
- Con la aza de platino tomar bacterias (tres veces) de las placas preparadas que ya han sido activadas (Ver anexo: E4).
- Y transferir al tubo estéril que contiene la mezcla agua-leche.
- Agitar, etiquetar y colocar inmediatamente en el congelador.



PASO 1: Con la aza se retira la bacteria



PASO 2: La bacteria retirada con la aza se coloca e los tubos



PASO 3: Se conserva en refrigeración

ANEXO F: ANÁLISIS DE TPHs

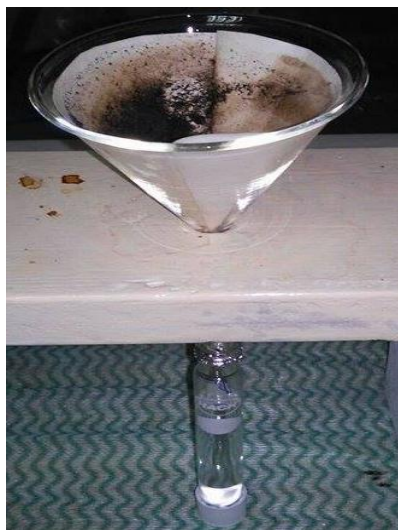
- Para el análisis de TPHs se calibra el Espectrofotómetro infrarrojo.
- Se pesa 2g de suelo, 0,3 de silica y 0,5 se Sulfato de sodio Na_2SO_4 . Y se coloca 10mL de hexano para extraer los TPHs de la muestra de suelo. Se somete a ultrasonido para homogenizar durante 15 minutos.
- Se filtra la mezcla homogénea, se mide los TPHs en el Espectrofotómetro infrarrojo.



PASO 1: Tamizado del suelo seco.



PASO 2: Colocando 10mL a los 2g de suelo con 0,3 de silica y 0,5 se Sulfato de sodio Na_2SO_4 .



PASO 3: Filtrar



PASO 4: Proceder a medir

ANEXO G: TÉCNICA DE LANDFARMING



ANEXO H: MUESTREO: Aleatorio simple



ANEXO I: DISPOSICIÓN FINAL



ANEXO J: INFORMES DE CONTROL DE CALIDAD



INFORME DE CONTROL DE CALIDAD 2016 N°: 001

ESPOCH

Solicitado por: Srta. Adriana Cedeño.
Dirección: Puerto Francisco de Orellana.

Fecha y hora de ingreso al laboratorio:	11/09/2015 17:00	Fecha final de Análisis	14/09/2015	T máx: 32°C T mín: 22°C
Toma de muestra:	Srta. Johanna Bastidas	Fecha y Hora	14/09/2015	12:00

Identificación: Suelo en proceso de remediación.

Parámetros, métodos y resultados de TPHs:

Método de Ensayo	Referencia	Uso Agrícola ₁₎	Uso Industrial ₂₎	Unidad ₃₎	Código	Resultado	Incertidumbre (K = 2)
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	M.P	120000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1	110000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1a	107000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1b	109000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1c	111000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1d	125000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1e	113000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2	106000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2a	109000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2b	103000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2c	102000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2d	105000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2e	106000	~

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.).
- (1a, 1b, 1c, 1d, 1e con *Pseudomona aeruginosa*) (2a, 2b, 2c, 2d, 2e con *Pseudomona putida*) M.P. suelo en proceso de tratamiento, código 1 y 2 sin microorganismos (blancos)



Ing. Armando Meléndrez
DIRECTOR TÉCNICO

Francisco de Orellana, 16 de marzo de 2016

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

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 CONTROL DE CALIDAD 2016 N°: 002

ESPOCH

Solicitado por: Srta. Adriana Cedeño.
Dirección: Puerto Francisco de Orellana.

Fecha y hora de ingreso al laboratorio:	07/10/2015 17:00	Fecha final de Análisis	09/10/2015	T máx: 32°C T mín: 22°C
Toma de muestra:	Srta. Johanna Bastidas	Fecha y Hora	07/10/2015	12:00

Identificación: Suelo en proceso de remediación.

Parámetros, métodos y resultados de TPHs:

Método de Ensayo	Referencia	Uso Agrícola ¹⁾	Uso Industrial ²⁾	Unidad	Código	Resultado	Incertidumbre (K = 2)
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	M.P	90000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1	80000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1a	60000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1b	78000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1c	65000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1d	73000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1e	113000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2	70000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2a	76000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2b	72000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2c	78000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2d	61000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2e	63000	~

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.).

(1a, 1b, 1c, 1d, 1e con *Pseudomona aeruginosa*) (2a, 2b, 2c, 2d, 2e con *Pseudomona putida*) M.P suelo en proceso de tratamiento, código 1 y 2 sin microorganismos (blancos)



Ing. Armando Meléndez
DIRECTOR TÉCNICO

Francisco de Orellana, 16 de marzo de 2016

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

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

INFORME DE CONTROL DE CALIDAD 2016 N°: 003

ESPOCH

Solicitado por: Srta. Adriana Cedeño.
Dirección: Puerto Francisco de Orellana.

Fecha y hora de ingreso al laboratorio:	26/10/2015 17:00	Fecha final de Análisis	28/10/2015	T máx: 32°C T mín: 22°C
Toma de muestra:	Srta. Johanna Bastidas	Fecha y Hora	26/10/2015	12:00

Identificación: Suelo en proceso de remediación.

Parámetros, métodos y resultados de TPHs:

Método de Ensayo	Referencia	Uso Agrícola ²⁾	Uso Industrial ³⁾	Unidad ¹⁾	Código	Resultado	Incertidumbre (K = 2)
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	M.P	80000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1	32000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1a	59000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1b	40000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1c	48000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1d	50000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1e	45000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2	31000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2a	40000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2b	32000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2c	52000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2d	59000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2e	32000	~

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.).
- (1a, 1b, 1c, 1d, 1e con *Pseudomonas aeruginosa*) (2a, 2b, 2c, 2d, 2e con *Pseudomonas putida*) M.P. suelo en proceso de tratamiento, código 1 y 2 sin microorganismos (blancos)



Ing. Armando Meléndrez
DIRECTOR TÉCNICO

Francisco de Orellana, 16 de marzo de 2016

Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del OAE.
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) 6 288 1715 Celular: 0991666858

INFORME DE CONTROL DE CALIDAD 2016 N°: 004

ESPOCH

Solicitado por: Srta. Adriana Cedeño.
Dirección: Puerto Francisco de Orellana.

Fecha y hora de ingreso al laboratorio:	10/11/2015 17:00	Fecha final de Análisis	12/11/2015	T máx: 32°C T mín: 22°C
Toma de muestra:	Srta. Johanna Bastidas	Fecha y Hora	10/11/2015	12:00

Identificación: Suelo en proceso de remediación.

Parámetros, métodos y resultados de TPHs:

Método de Ensayo	Referencia	Uso Agrícola ¹⁾	Uso Industrial ²⁾	Unidad ³⁾	Código	Resultado	Incertidumbre (K = 2)
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	M.P	35000	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1	16974	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1a	18182	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1b	15826	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1c	12330	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1d	14322	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1e	15656	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2	14619	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2a	14645	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2b	13290	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2c	10390	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2d	13803	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2e	13244	~

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.).
- (1a, 1b, 1c, 1d, 1e con *Pseudomonas aeruginosa*) (2a, 2b, 2c, 2d, 2e con *Pseudomonas putida*) M.P. suelo en proceso de tratamiento, código 1 y 2 sin microorganismos (blancos)




Ing. Armando Meléndez
DIRECTOR TÉCNICO

Francisco de Orellana, 16 de marzo de 2016

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

INFORME DE CONTROL DE CALIDAD 2016 N°: 005

ESPOCH

Solicitado por: Srta. Adriana Cedeño.
Dirección: Puerto Francisco de Orellana.

Fecha y hora de ingreso al laboratorio:	04/12/2015 17:00	Fecha final de Análisis	02/12/2015	T máx: 32°C T mín: 22°C
Toma de muestra:	Srta. Johanna Bastidas	Fecha y Hora	04/12/2015	12:00

Identificación: Suelo en proceso de remediación.

Parámetros, métodos y resultados de TPHs:

Método de Ensayo	Referencia	Uso Agrícola ²⁾	Uso Industrial ³⁾	Unidad ¹⁾	Código	Resultado	Incertidumbre (K = 2)
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	M.P	13396	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1	12276	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1a	10932	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1b	7427	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1c	8779	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1d	8584	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	1e	9024	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2	13184	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2a	10717	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2b	9944	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2c	6074	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2d	9128	~
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	2e	10788	~

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.).
- (1a, 1b, 1c, 1d, 1e con *Pseudomonas aeruginosa*) (2a, 2b, 2c, 2d, 2e con *Pseudomonas putida*) M.P suelo en proceso de tratamiento, código 1 y 2 sin microorganismos (blancos)




Ing. Armando Meléndrez
DIRECTOR TÉCNICO

Francisco de Orellana, 16 de marzo de 2016

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

INFORME DE CONTROL DE CALIDAD 2016 N°: 006

ESPOCH

Solicitado por: Srta. Adriana Cedeño.
Dirección: Puerto Francisco de Orellana.

Fecha y hora de ingreso al laboratorio:	19/12/2015 17:00	Fecha final de Análisis	21/12/2015	T máx: 32°C T mín: 22°C
Toma de muestra:	Srta. Johanna Bastidas	Fecha y Hora	19/12/2015	12:00

Identificación: Suelo en proceso de remediación.

Parámetros, métodos y resultados de TPHs:

Método de Ensayo	Referencia	Uso Agrícola ₂₎	Uso Industrial ₃₎	Unidad ₁₎	Código	Resultado	Incertidumbre (K = 2)
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	M.P	10000	-

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.).
- M.P suelo en proceso de tratamiento.



Ing. Armando Meléndrez
DIRECTOR TÉCNICO

Francisco de Orellana, 16 de marzo de 2016

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

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

INFORME DE CONTROL DE CALIDAD 2016 N°: 007

ESPOCH

Solicitado por: Srta. Adriana Cedeño.
Dirección: Puerto Francisco de Orellana.

Fecha y hora de ingreso al laboratorio:	04/02/2016 17:00	Fecha final de Análisis	06/02/2016	T máx: 32°C
				T mín: 22°C
Toma de muestra:	Srta. Johanna Bastidas	Fecha y Hora	04/02/2016	12:00

Identificación: Suelo en proceso de remediación.

Parámetros, métodos y resultados de TPHs:


Método de Ensayo	Referencia	Uso Agrícola ¹⁾	Uso Industrial ²⁾	Unidad ³⁾	Código	Resultado	Incertidumbre (K = 2)
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	mg/Kg	M.P	7000	-

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.).
- M.P suelo en proceso de tratamiento.




Ing. Armando Meléndez
DIRECTOR TÉCNICO

Francisco de Orellana, 16 de marzo de 2016

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

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

INFORME DE CONTROL DE CALIDAD 2016 N°: 008

ESPOCH

Solicitado por: Srta. Adriana Cedeño.
Dirección: Puerto Francisco de Orellana.

Fecha y hora de ingreso al laboratorio:	22/02/2016 17:00	Fecha final de Análisis	24/02/2016	T máx: 32°C T mín: 22°C
Toma de muestra:	Srta. Johanna Bastidas	Fecha y Hora	22/02/2016	12:00

Identificación: Suelo en proceso de remediación.

Parámetros, métodos y resultados de TPHs:

Método de Ensayo	Referencia	Uso Agrícola ¹⁾	Uso Industrial ²⁾	Unidad ³⁾	Código	Resultado	Incertidumbre (K = 2)
ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2.500	< 4.000	mg/Kg	M.P	5200	-

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.).

M.P suelo en proceso de tratamiento.



Ing. Armando Meléndez
DIRECTOR TÉCNICO

Francisco de Orellana, 16 de marzo de 2016

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

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

INFORME DE CONTROL DE CALIDAD 2016 N°: 009

ESPOCH

Solicitado por: Srta. Adriana Cedeño.
Dirección: Puerto Francisco de Orellana.

Fecha y hora de ingreso al laboratorio:	14/03/2016 10:05	Fecha final de Análisis	22/03/2016	T máx: 32°C
Toma de muestra:	Srta. Johanna Bastidas	Fecha y Hora	14/03/2016	T mín: 22°C
				10:00

Identificación: Suelo en proceso de remediación. M.P

Parámetros, métodos y resultados:

Parámetros	Método de Ensayo	Referencia	Uso Agrícola ²⁾	Uso Industrial ³⁾	Ecosistemas Sensibles ⁴⁾	Unidad ¹⁾	M.P	Incertidumbre (K = 2)
*Cadmio	PEE-LABSU-06/20	EPA 3050 B;SM 3030 B, 3111 B	< 2	< 10	< 1	mg/Kg	< 1,5	~
*Niquel	PEE-LABSU-06/23	EPA 3050 B;SM 3030 B, 3111 B	< 50	< 100	< 40	mg/Kg	31,88	~
*Plomo	PEE-LABSU-06/24	EPA 3050 B;SM 3030 B, 3111 B	< 100	< 500	< 80	mg/Kg	23,70	~
*Hidrocarburos totales	ITE-AQLAB-56	EPA 3550 B, 418.1	< 2 500	< 4 000	< 1 000	mg/Kg	2 135,11	~
*Hidrocarburos aromáticos	ITE-AQLAB-55	EPA 8270B,3550 C, 3630 C	< 2	< 5	< 1	mg/Kg	< 0,10	~

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.

M.P suelo en proceso de tratamiento.




Ing. Nelson Shiguango

ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA

Francisco de Orellana, 22 de marzo 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 Aluminia, detrás de Concesionario Mazda. Barrio Con Hogar.

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

ANEXO H: CERTIFICADOS DE LAS CEPAS



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p>Specifications Microorganism Name: Pseudomonas aeruginosa Catalog Number: 0693 Lot Number: 693-97 Reference Number: ATCC® 15442™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4</p>	<p>Expiration Date: 2017/4/30 Release Information: Quality Control Technologist: Carol J Stanoch Release Date: 2015/5/13</p>
<p style="text-align: center;">Performance</p> <p>Macroscopic Features: Large, low convex, circular to irregular shaped, rough, gray with weak beta hemolysis; 2 colony types, one is flatter, spreading & the other is smaller, lighter in color.</p> <p>Microscopic Features: Straight or slightly curved gram negative rod.</p> <p>Medium: SBAP</p> <p>Method: Gram Stain (1)</p>	
<p>ID System: Vitek GN (1) See attached ID System results document.</p>	<p>Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): positive (1) Motility B Medium: positive</p> <p style="text-align: center;"> Brad Gaskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE</p>
<p><small>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packaging slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p> <p><small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small></p> <p><small>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small></p> <p>  TESTING CERT #2855.01</p>	

MEDIBAC-INCSA.
 Distribuidor para el Ecuador de
MICROBIOLOGICS
 Registro Sanitario AD-541-04-13

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Pseudomonas putida Catalog Number: 0702 Lot Number: 702-16 Reference Number: ATCC® 31483™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 2	Expiration Date: 2016/10/31 Release Information: Quality Control Technologist: Kieshia L. Negen Release Date: 2014/11/13
---	---

Performance	
Macroscopic Features: Large, circular, convex, entire edge, pale gray, smooth and glistening.	Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram negative straight or slightly curved rods with rounded ends.	Method: Gram Stain (1)

ID System: Vitek GN (1)	Results	Other Features / Challenges: Results
Phenotypic Features		(1) Oxidase (Kovacs): positive
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-	(1) Motility B Medium: positive
ADONITOL	-	SBAP/42C/O2: no growth
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-	
L-ARABITOL	-	
D-CELLOBIOSE	-	
BETA-GALACTOSIDASE	-	
H2S PRODUCTION	-	
BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-	
Glutamyl Arylamidase pNA	-	
D-GLUCOSE	+	
GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	+	
FERMENTATION/GLUCOSE	-	
BETA-GLUCOSIDASE	-	
D-MALTOSE	-	
D-MANNITOL	-	
D-MANNITOL	+	
BETA-XYLOSIDASE	-	
BETA-Alanine arylamidase pNA	-	
L-Proline ARYLAMIDASE	+	
LIPASE	-	
PALATINOSE	-	
Tyrosine ARYLAMIDASE	+	
UREASE	-	
D-SORBITOL	-	
SACCHAROSE/SUCROSE	-	
D-TAGATOSE	-	
D-TREHALOSE	-	
CITRATE (SODIUM)	+	
MALONATE	+	
5-KETO-D-GLUCONATE	-	
L-LACTATE alkalinization	+	
ALPHA-GLUCOSIDASE	-	
SUCCINATE alkalinization	+	
BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	-	
ALPHA-GALACTOSIDASE	-	
PHOSPHATASE	-	
Glycine ARYLAMIDASE	-	
ORNITHINE DECARBOXYLASE	-	
LYSINE DECARBOXYLASE	-	
L-HISTIDINE assimilation	+	
COURMARATE	+	
BETA-GLUCORONIDASE	-	
O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+	
Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	-	
L-MALATE assimilation	+	
ELLMAN	-	
L-LACTATE assimilation	-	



Brad Goskovicz, President
 AUTHORIZED SIGNATURE

MEDIRAC-INCSA
 Distribuidor para el Ecuador de
MICROBIOLOGICS
 Registro Sanitario AD-541-04-13

ANEXO I: TIEMPOS Y PARÁMETRO DE CONTROL

PARAMETRO		TIEMPO DE CONTROL
TECNICA DE LANDFARMING (6 meses)	Materia orgánica	Trimestral
	NPK	Una aplicación durante el tratamiento
	Material de sustrato (Aserrín, tamo de: café, arroz, maní, etc.)	Una aplicación durante el tratamiento viendo los requerimientos
	Aireación	Tres veces por semana
	Humectación o Irrigación	Tres veces por semana
Análisis	pH	Semanalmente
	Temperatura	Semanalmente
	Humedad	Semanalmente
	TPHs	De acuerdo a la disponibilidad del laboratorio

ANEXO J: MANUAL DE PROCEDIMIENTOS

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL AGAR PCA

ÍNDICE

1. OBJETIVO:	2
2. ALCANCE:.....	2
3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS:	2
4. RESPONSABILIDADES:	2
5. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA.....	2
6. PROCEDIMIENTO	3
6.1 FLUJOGRAMA.....	3
ANEXOS:	3

ELABORADO:	REVISADO:	APROBADO:
Johanna Bastidas Adriana Cedeño	Ing. Nelson Shiguango ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA	Ing. Armando Meléndrez DIRECTOR TÉCNICO

1. OBJETIVO:

Establecer los lineamientos y procedimientos necesarios para la preparación del agar PCA.

2. ALCANCE:

Preparar del agar PCA para utilizarlo para los siguientes procedimientos.

3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS:

MDP: Manual de procedimientos

DT: Director técnico

RC: Responsable de calidad

ADT: Asistente de la dirección técnica

TL: Técnico de laboratorio

4. RESPONSABILIDADES:

PROCEDIMIENTO	DIRECTOR TÉCNICO	RESPONSABLE DE CALIDAD	ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA	TÉCNICO DE LABORATORIO
PREPARACIÓN DEL AGAR PCA		R	C	

R= Responsabilidad

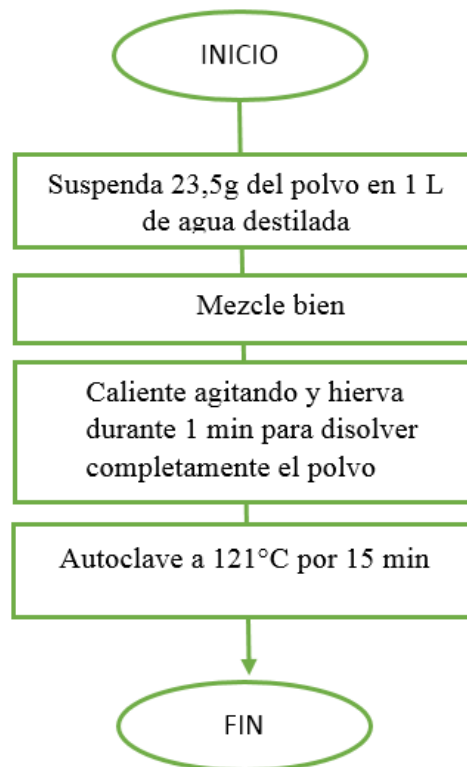
C= Colaboración

5. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

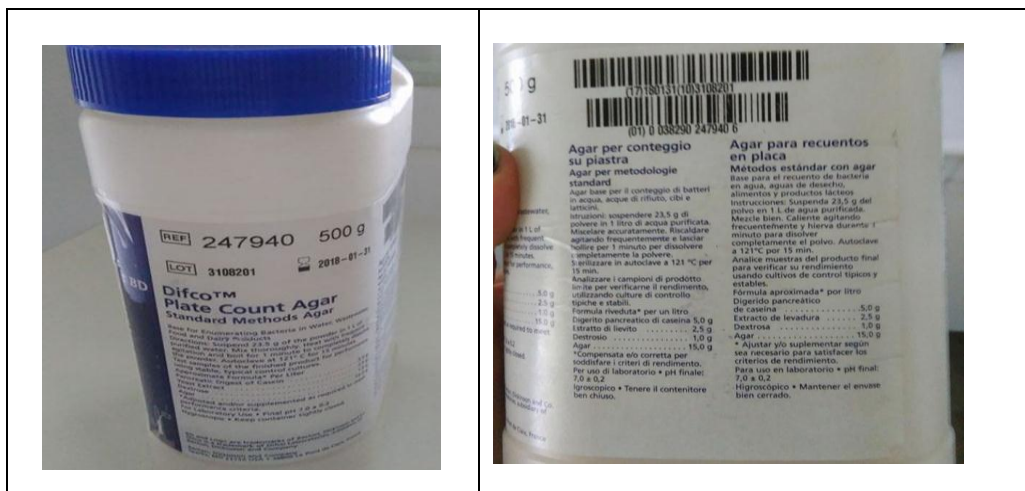
- ITO-AQLAB-08 Manejo de cepas de referencia.

6. PROCEDIMIENTO

6.1 FLUJOGRAMA



ANEXOS:



PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL AGUA DE PEPTONA

ÍNDICE

1. OBJETIVO:	2
2. ALCANCE:	2
3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS:	2
4. RESPONSABILIDADES:	2
5. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA.....	2
6. PROCEDIMIENTO	3
6.1 FLUJOGRAMA.....	3

ELABORADO:	REVISADO:	APROBADO:
Johanna Bastidas Adriana Cedeño	Ing. Nelson Shiguango ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA	Ing. Armando Meléndrez DIRECTOR TÉCNICO

1. OBJETIVO:

Establecer los lineamientos y procedimientos necesarios para la preparación del agua de peptona.

2. ALCANCE:

Preparar el agua de peptona para utilizarlo para los siguientes procedimientos.

3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS:

MDP: Manual de procedimientos

DT: Director técnico

RC: Responsable de calidad

ADT: Asistente de la dirección técnica

TL: Técnico de laboratorio

4. RESPONSABILIDADES:

PROCEDIMIENTO	DIRECTOR TÉCNICO	RESPONSABLE DE CALIDAD	ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA	TÉCNICO DE LABORATORIO
PREPARACIÓN DEL AGUA DE PEPTONA		R	C	

R= Responsabilidad

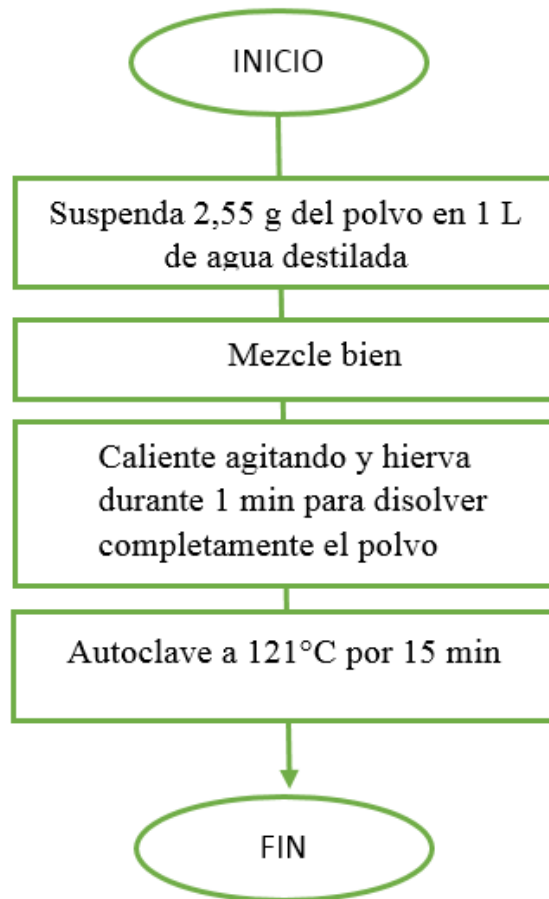
C= Colaboración

5. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

- ITO-AQLAB-08 Manejo de cepas de referencia

6. PROCEDIMIENTO

6.1 FLUJOGRAMA



PROCEDIMIENTO PARA LA ACTIVACIÓN DE CEPAS

ÍNDICE

1. OBJETIVO:	2
2. ALCANCE:.....	2
3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS:	2
4. RESPONSABILIDADES:	2
5. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA.....	2
6. PROCEDIMIENTO	3
6.1 FLUJOGRAMA.....	3
ANEXOS:	4

ELABORADO:	REVISADO:	APROBADO:
Johanna Bastidas Adriana Cedeño	Ing. Nelson Shiguango ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA	Ing. Armando Meléndrez DIRECTOR TÉCNICO

1. OBJETIVO:

Establecer los lineamientos y procedimientos necesarios para la activación de cepas.

2. ALCANCE:

Activar la cepa para utilizarlo para la degradación de hidrocarburos.

3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS:

MDP: Manual de procedimientos

DT: Director técnico

RC: Responsable de calidad

ADT: Asistente de la dirección técnica

TL: Técnico de laboratorio

4. RESPONSABILIDADES:

PROCEDIMIENTO	DIRECTOR TÉCNICO	RESPONSABLE DE CALIDAD	ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA	TÉCNICO DE LABORATORIO
ACTIVACIÓN DE CEPAS		R	C	

R= Responsabilidad

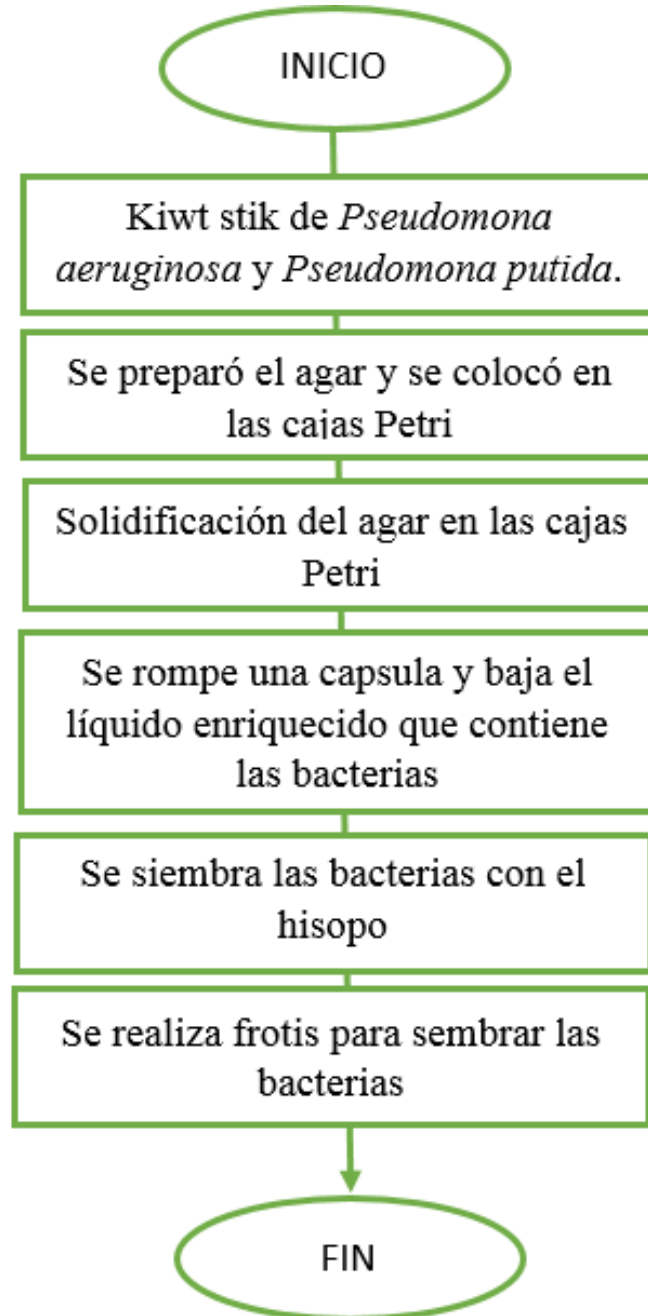
C= Colaboración

5. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

- ITO-AQLAB-08 Manejo de cepas de referencia.

6. PROCEDIMIENTO

6.1 FLUJOGRAMA



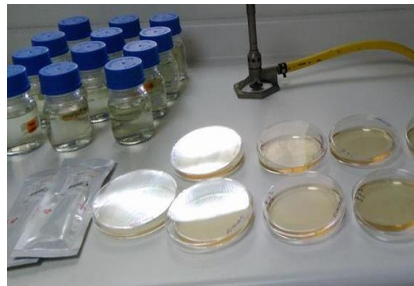
ANEXOS:



PASO 1



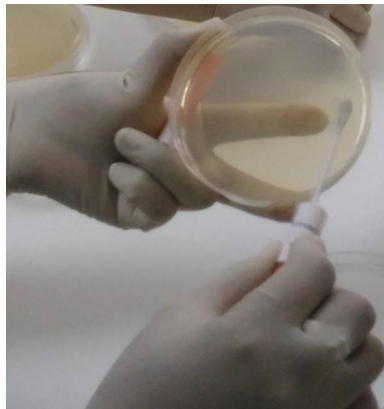
PASO 2



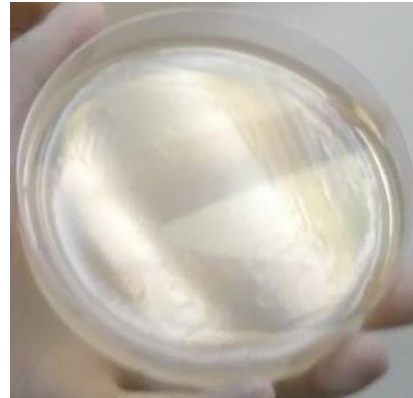
PASO 3



PASO 4



PASO 5



PASO 6

PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE TPHs

ÍNDICE

1. OBJETIVO:	2
2. ALCANCE:.....	2
3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS:	2
4. RESPONSABILIDADES:	2
5. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA.....	2
6. PROCEDIMIENTO	3
6.1 FLUJOGRAMA.....	3
ANEXOS:	4

ELABORADO:	REVISADO:	APROBADO:
<p style="text-align: center;">Johanna Bastidas</p> <p style="text-align: center;">Adriana Cedeño</p>	<p>Ing. Nelson Shiguango</p> <p>ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA</p>	<p>Ing. Armando Meléndrez</p> <p>DIRECTOR TÉCNICO</p>

1. OBJETIVO:

Establecer los lineamientos y procedimientos necesarios para el análisis de TPHs.

2. ALCANCE:

Analizar los TPHs para observar la eficiencia de las cepas puras.

3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS:

MDP: Manual de procedimientos

DT: Director técnico

RC: Responsable de calidad

ADT: Asistente de la dirección técnica

TL: Técnico de laboratorio

4. RESPONSABILIDADES:

PROCEDIMIENTO	DIRECTOR TÉCNICO	RESPONSABLE DE CALIDAD	ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA	TÉCNICO DE LABORATORIO
ANÁLISIS DE TPHS			R	C

R= Responsabilidad

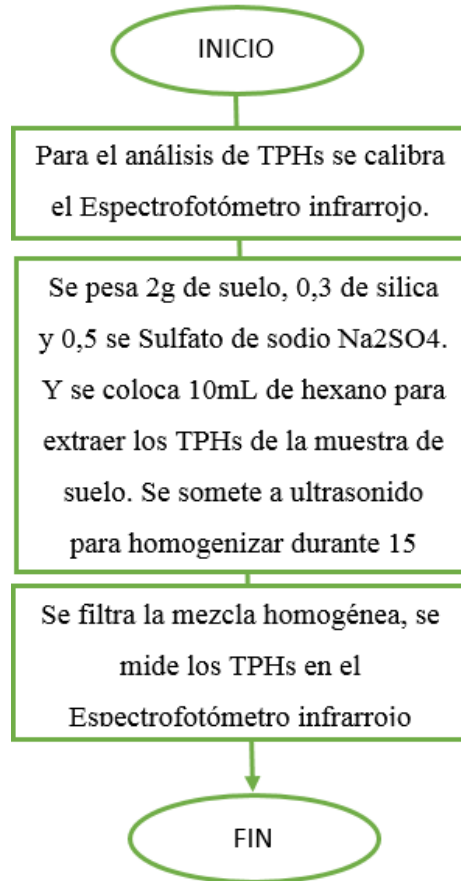
C= Colaboración

5. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

- ITE-AQLAB-56 Análisis de TPHs

6. PROCEDIMIENTO

6.1FLUJOGRAMA



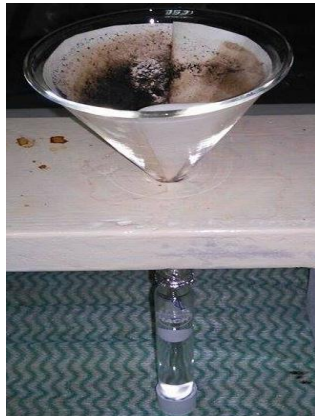
ANEXOS:



PASO 1: Tamizado del suelo seco.



PASO 2: Colocando 10mL a los 2g de suelo con 0,3 de silica y 0,5 se Sulfato de sodio Na_2SO_4 .



PASO 3: Filtrar



PASO 4: Proceder a medir

PROCEDIMIENTO PARA LA MASIFICACIÓN DE LA *Pseudomona putida*

ÍNDICE

1. OBJETIVO:	2
2. ALCANCE:	2
3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS:	2
4. RESPONSABILIDADES:	2
5. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA.....	2
6. PROCEDIMIENTO	3
6.1 FLUJOGRAMA	3
ANEXOS:	4

ELABORADO:	REVISADO:	APROBADO:
<p style="text-align: center;">Johanna Bastidas</p> <p style="text-align: center;">Adriana Cedeño</p>	<p style="text-align: center;">Ing. Nelson Shiguango ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA</p>	<p style="text-align: center;">Ing. Armando Meléndrez DIRECTOR TÉCNICO</p>

1. OBJETIVO:

Establecer los lineamientos y procedimientos necesarios para la masificación de la *pseudomona putida*.

2. ALCANCE:

Masificar la *pseudomona putida* para que degrade el hidrocarburo en el suelo en menos tiempo.

3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS:

MDP: Manual de procedimientos

DT: Director técnico

RC: Responsable de calidad

ADT: Asistente de la dirección técnica

TL: Técnico de laboratorio

4. RESPONSABILIDADES:

PROCEDIMIENTO	DIRECTOR TÉCNICO	RESPONSABLE DE CALIDAD	ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA	TÉCNICO DE LABORATORIO
MASIFICACIÓN DE LA <i>Pseudomona putida</i>		R	C	

R= Responsabilidad

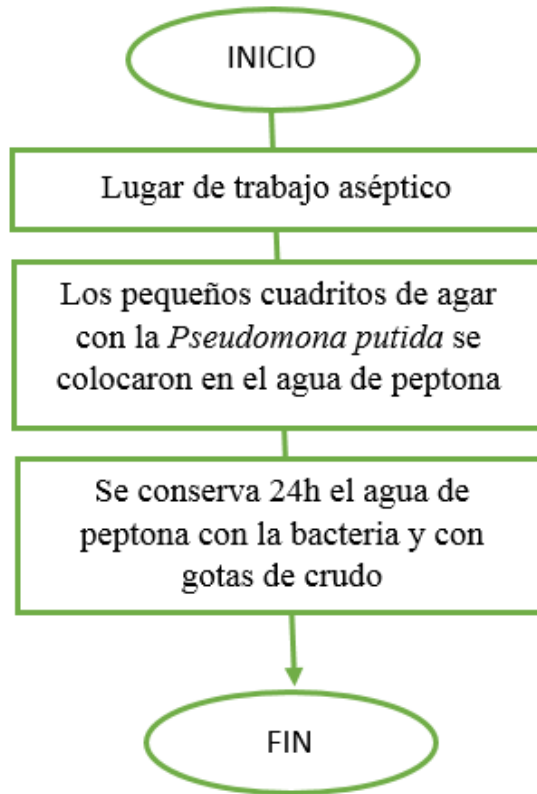
C= Colaboración

5. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

- ITO-AQLAB-08 Manejo de cepas de referencia.

6. PROCEDIMIENTO

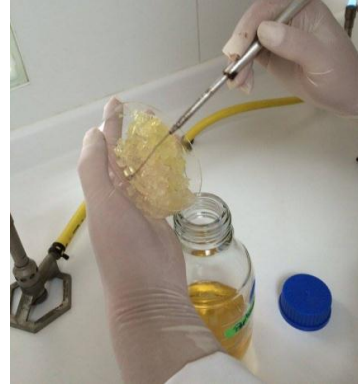
6.1FLUJOGRAMA



ANEXOS:




PASO 1



PASO 2



PASO 3


	PROCEDIMIENTO PARA LA CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>Pseudomona aeruginosa</i> y <i>Pseudomona putida</i> (CRIOBIALES)	PROC: 06 AQ-LAB Página 1 de 4
---	--	-------------------------------------

PROCEDIMIENTO PARA LA CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS DE *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona putida* (CRIOBIALES)

ÍNDICE

1. OBJETIVO:	2
2. ALCANCE:.....	2
3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS:	2
4. RESPONSABILIDADES:	2
5. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA.....	2
6. PROCEDIMIENTO	3
6.1 FLUJOGRAMA.....	3
ANEXOS:	4

ELABORADO:	REVISADO:	APROBADO:
<p style="text-align: center;">Johanna Bastidas</p> <p style="text-align: center;">Adriana Cedeño</p>	<p style="text-align: center;">Ing. Nelson Shiguango</p> <p style="text-align: center;">ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA</p>	<p style="text-align: center;">Ing. Armando Meléndrez</p> <p style="text-align: center;">DIRECTOR TÉCNICO</p>

	PROCEDIMIENTO PARA LA CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>Pseudomona aeruginosa</i> y <i>Pseudomona putida</i> (CRIOBIALES)	PROC: 06 AQ-LAB Página 2 de 4
---	--	-------------------------------------

1. OBJETIVO:

Establecer los lineamientos y procedimientos necesarios para la conservación de las cepas de *pseudomona aeruginosa* y *pseudomona putida* (Criobiales).

2. ALCANCE:

Conservar las cepas de *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona putida* (Criobiales) para posteriormente masificarlas y degrade el hidrocarburo en el suelo.

3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS:

MDP: Manual de procedimientos

DT: Director técnico

RC: Responsable de calidad

ADT: Asistente de la dirección técnica

TL: Técnico de laboratorio

4. RESPONSABILIDADES:

PROCEDIMIENTO	DIRECTOR TÉCNICO	RESPONSABLE DE CALIDAD	ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA	TÉCNICO DE LABORATORIO
CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>Pseudomona aeruginosa</i> y <i>Pseudomona putida</i> (CRIOBIALES)		R	C	

R= Responsabilidad

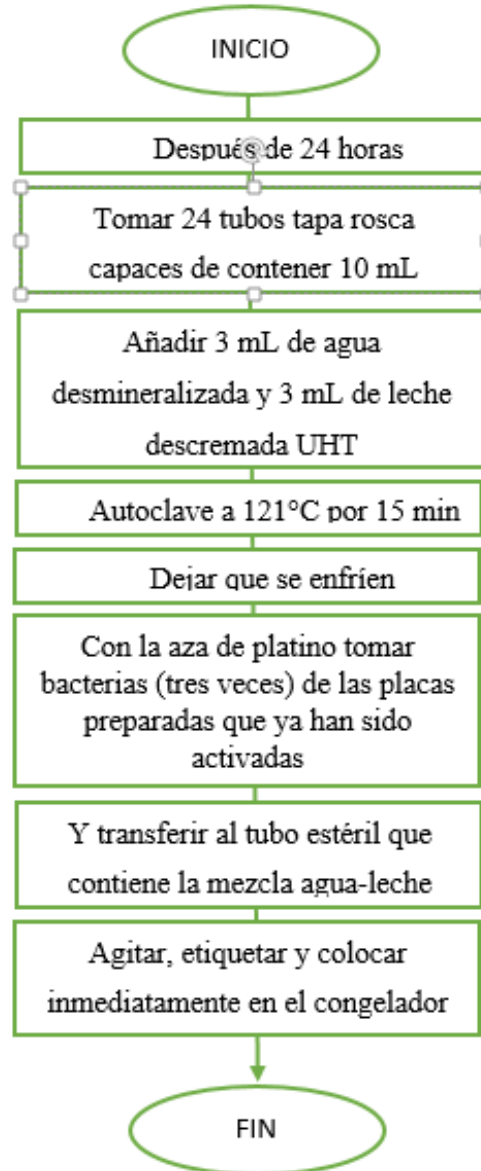
C= Colaboración

5. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

- ITO-AQLAB-08 Manejo de cepas de referencia.

6. PROCEDIMIENTO

6.1 FLUJOGRAMA



ANEXOS:



PASO 1: Con la aza se retira la bacteria



PASO 2: La bacteria retirada con la aza se coloca e los tubos



PASO 3: Se conserva en refrigeración

PROCEDIMIENTO PARA LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE LANDFARMING

ÍNDICE

1. OBJETIVO:	2
2. ALCANCE:.....	2
3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS:	2
4. RESPONSABILIDADES:	2
5. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA.....	2
6. PROCEDIMIENTO	3
6.1 FLUJOGRAMA	3
ANEXOS:	4

ELABORADO:	REVISADO:	APROBADO:
Johanna Bastidas Adriana Cedeño	Ing. Nelson Shiguango ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA	Ing. Armando Meléndrez DIRECTOR TÉCNICO

1. OBJETIVO:

Establecer los lineamientos y procedimientos necesarios para la aplicación de la técnica de Landfarming.

2. ALCANCE:

Aplicar de la técnica de Landfarming.

3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS:

MDP: Manual de procedimientos

DT: Director técnico

RC: Responsable de calidad

ADT: Asistente de la dirección técnica

TL: Técnico de laboratorio

4. RESPONSABILIDADES:

PROCEDIMIENTO	DIRECTOR TÉCNICO	RESPONSABLE DE CALIDAD	ASISTENTE DE LA DIRECCIÓN TÉCNICA	TÉCNICO DE LABORATORIO
APLICAR DE LA TÉCNICA DE LANDFARMING			R	C

R= Responsabilidad

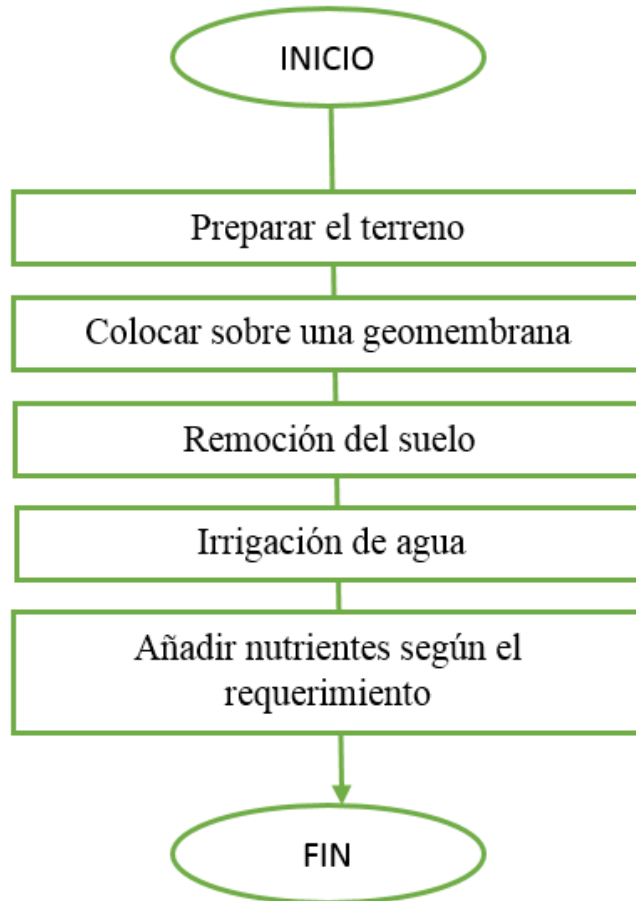
C= Colaboración

5. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

- ITO-AQLAB-08 Manejo de cepas de referencia.

6. PROCEDIMIENTO

6.1FLUJOGRAMA



ANEXOS:

Relación de Nutrientes

C: N: P Suelo Agrícola

100:10:1 W (Peso)

Donde:

Pcs: Peso suelo contaminado

[TPH]= Concentración de hidrocarburos totales de petróleo

Hay que tomar en cuenta que el porcentaje de Carbono total dentro de los TPHs es del 78 %.

% CTPH= 78 %

Entonces tenemos:

$$W\ TPH = Pcs * [TPH]$$

Relación Carbono:

$$WC = [TPH] * 0.78$$

Relación Nitrógeno:

$$WN = \frac{WC}{10}$$

Relación Fósforo:

$$WP = \frac{WC}{100}$$

Datos:

$$Psc = ?\ kg$$

$$[TPH] = ?\ mg/Kg$$

Cálculos:

$$W\ TPH = Pcs * [TPH]$$

$$W\ TPH = ?\ Kg$$

$$WC = [TPH] * 0.78$$

$$WC = ?\ Kg$$

$$WN = \frac{WC}{10}$$

	PROCEDIMIENTO PARA LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE LANDFARMING	PROC: 07 AQ-LAB Página 5 de 8
---	--	-------------------------------------

$$WN = ? Kg$$

$$WP = \frac{WC}{100}$$

$$WP = ? Kg$$

Concentración de N y P en los fertilizantes.

Úrea = 46 % N

MAP= 11 % N y 52 % P

Cálculo de la Dosificación de nutrientes si se conoce la cantidad de N y P en el suelo.

WPs= Concentración de Fósforo en el suelo (Kg)

WNs= Concentración de Nitrógeno en el suelo (Kg)

Datos:

N total suelo= ? mg/Kg

P disponible suelo= ? mg/Kg

WPs= ? Kg

WNs= ? Kg

Cantidad (kg) a dosificar de MAP considerando el porcentaje de P en el suelo

$$WPM_{ap} = (WP - WPs)$$

$$WPM_{ap} = ? Kg$$

$$MAP = (WPM_{ap} / 0,52)$$

$$MAP = ? Kg$$

Cantidad (kg) a dosificar de ÚREA considerando el porcentaje de N en el suelo y la cantidad de N en el MAP.

$$WN_{Úrea} = WN - (WNs + WN_{MAP})$$

$$WN_{MAP} = ? Kg$$

$$WN_{Úrea} = WN - (WNs + WN_{MAP})$$

$$WN_{Úrea} = ? Kg$$

2. MUESTREO: Aleatorio simple



3. DISPOSICIÓN FINAL:

