

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE-QUITO**

**CARRERA:  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS  
NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:  
“EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE *Trichoderma* sp Y *Pseudomona* sp  
PARA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON  
HIDROCARBUROS”**

**AUTOR  
STALIN DAVID MUÑOZ CUAICAL**

**TUTORA  
LAURA ELIZABETH HUACHI ESPÍN**

**Quito, julio del 2016**

## Cesión de derechos de autor

Yo, Stalin David Muñoz Cuaical, con documento de identificación N° 1721063814, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: “Evaluación de la eficacia de *Trichoderma* sp y *Pseudomonas* sp para biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos”, el mismo que ha sido desarrollado por optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



.....  
Stalin David Muñoz Cuaical

CI: 1721063814

Quito, julio del 2016

### **Declaratoria de coautoría del docente tutora**

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “Evaluación de la eficacia de *Trichoderma* sp y *Pseudomonas* sp para biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos”, realizado por Stalin David Muñoz Cuaical, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerado como trabajo final de titulación.

Quito, julio del 2016



.....  
Laura Elizabeth Huachi Espín

C.I: 1711113744

## Índice

<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 1.....</b>	<b>5</b>
<b>Marco conceptual.....</b>	<b>5</b>
1.1. Petróleo.....	5
1.1.1. Clasificación del petróleo.....	5
1.1.2. Impactos en el suelo por el petróleo.....	5
1.2. Hidrocarburos .....	6
1.2.1. Hidrocarburos totales policíclicos (TPH).....	7
1.3. Suelo.....	8
1.4. Biorremediación .....	8
1.4.1. Biorremediación de petróleo en el suelo.....	10
1.4.2. Microorganismos para biorremediación de petróleo en suelos.....	11
1.4.2.1. Hongos con potencial biorremediador. ....	12
1.4.2.1.1. <i>Trichoderma sp.</i> .....	12
1.4.2.2. Bacterias con potencial biorremediador. ....	16
1.4.2.2.1. <i>Pseudomonas sp.</i> .....	17
1.5. Consorcios microbianos .....	21
1.6. Fundamentación Legal .....	22
<b>Capítulo 2.....</b>	<b>25</b>
<b>Metodología .....</b>	<b>25</b>
2.1. Fase de campo .....	25
2.1.1. Georreferenciación del sitio de muestreo.....	25
2.1.2. Muestreo de suelos.....	25
2.1.2.1. Muestreo de suelos para análisis físico-químico.....	26
2.1.2.2. Muestreo de suelos para análisis microbiológico.....	26
2.1.3. Obtención de petróleo. ....	26
2.2. Fase de laboratorio. ....	26
2.2.1. Diluciones. ....	26
2.2.2. Medios de cultivo utilizados .....	27
2.2.3. Análisis Microbiológico de microorganismos. ....	27
2.2.3.1. Siembra de superficie en caja Petri. ....	27
2.2.3.2. Aislamiento de microorganismos.....	27
2.2.3.3. Aislamiento e identificación de <i>Pseudomonas</i> .....	28
2.2.3.3.1. Selección y resiembra de bacterias. ....	28
2.2.3.3.2. Caracterización macroscópica .....	28
2.2.3.3.3. Caracterización microscópica .....	28
2.2.3.3.4. Identificación con pruebas bioquímicas .....	29
2.2.3.3.5. Conteo de colonias .....	29

2.2.3.3.6. Conservación de <i>Pseudomonas</i> .....	30
2.2.3.4. Inoculación de <i>Pseudomonas</i> sp en suelo con petróleo.....	30
2.2.3.4.1. Preparación del cultivo bacteriano.....	30
2.2.3.4.2. Preparación de la solución. ....	30
2.2.3.4.3. Medición de la concentración por espectrofotometría . ....	31
2.2.3.4.4. Aplicación del inóculo de <i>Pseudomonas</i> .....	31
2.2.3.5. Aislamiento e identificación de <i>Trichoderma</i> .....	31
2.2.3.5.1. Caracterización macroscópica .....	31
2.2.3.5.2. Caracterización microscópica e identificación de <i>Trichoderma</i> .....	32
2.2.3.5.3. Cinética de crecimiento.....	32
2.2.3.5.4. Conservación de <i>Trichoderma</i> .....	32
2.2.3.6. Inoculación de <i>Trichoderma</i> sp en suelo con petróleo.....	32
2.2.3.6.1. Preparación de la solución. ....	33
2.2.3.6.2. Conteo de esporas. ....	33
2.2.3.6.3. Inoculación y aplicación del inóculo de <i>Trichoderma</i> . ....	34
2.2.3.7. Inoculación y aplicación del consorcio microbiano.....	34
2.2.3.8. Aplicación de agua al suelo testigo.....	34
2.2.4. Montaje del ensayo. ....	34
2.2.4.1. Preparación de las cajas de ensayo.....	34
2.2.4.2. Preparación del suelo.....	34
2.2.4.3. Adición de petróleo las cajas de ensayos. ....	35
2.2.4.4. Tratamientos del ensayo. ....	35
2.2.4.5. Disposición de los tratamientos del ensayo.....	35
2.2.5. Análisis físico-químicos.....	36
2.2.6. Análisis de hidrocarburo (TPH).....	37
2.2.7. Diseño Experimental. ....	38
2.2.7.1. Análisis estadístico. ....	38
2.2.7.2. Manejo de las variables del ensayo .....	38
2.2.7.2.1. Temperatura.....	39
2.2.7.2.2. Humedad .....	39
2.2.7.2.3. pH y conductividad eléctrica.....	39

**Capítulo 3: ..... 40**

**Resultados y discusión ..... 40**

3.1. Análisis físico químico.....	40
3.1.1. Macro elementos. ....	40
3.1.2. Medición de variables. ....	45
3.1.2.1. Potencial de hidrógeno (pH).....	45
3.1.2.2. Conductividad eléctrica (C.E). ....	47
3.1.2.3. Temperatura.....	48
3.1.2.4. Humedad. ....	50
3.1.3. Caracterización macro y microscópica de <i>Trichoderma</i> .....	52
3.1.3.1. Caracterización macroscópica.....	52
3.1.3.2. Caracterización microscópica.....	54
3.1.4. Identificación de <i>Pseudomonas</i> por prueba Microgen.....	55
3.1.5. Medición de Hidrocarburos totales policíclicos (TPH). ....	58

<b>Conclusiones .....</b>	<b>61</b>
<b>Recomendaciones .....</b>	<b>62</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>63</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>70</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Criterios de remediación o restauración de suelos.....	7
<b>Tabla 2.</b> Tipos de biorremediación. ....	9
<b>Tabla 3.</b> Requerimientos para la biorremediación. ....	9
<b>Tabla 4.</b> Estrategias de biorremediación. ....	10
<b>Tabla 5.</b> Géneros de hongos utilizados para la biorremediación de suelos.....	12
<b>Tabla 6.</b> Géneros de bacterias utilizadas para la biorremediación de suelos .....	17
<b>Tabla 7.</b> Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos .....	23
<b>Tabla 8.</b> Coordenadas del sitio de investigación y sus condiciones climáticas. ....	25
<b>Tabla 9.</b> Tratamientos del ensayo.....	35
<b>Tabla 10.</b> Parámetros analizados y su metodología. ....	37
<b>Tabla 11.</b> Parámetros de TPH analizados y su metodología. ....	38
<b>Tabla 12.</b> Características del diseño experimental.....	38
<b>Tabla 13.</b> Resultados de los macro elementos de los análisis físico – químicos .....	40
<b>Tabla 14.</b> Análisis de varianza para pH, Tukey al 5% .....	45
<b>Tabla 15.</b> Análisis de varianza para C.E, Tukey al 5%.....	47
<b>Tabla 16.</b> Análisis de varianza para temperatura, Tukey al 5%.....	48
<b>Tabla 17.</b> Análisis de varianza para humedad, Tukey al 5%. ....	50
<b>Tabla 18.</b> Caracterización macroscópica de <i>Trichoderma</i> .....	52
<b>Tabla 19.</b> Caracterización microscópica de <i>Trichoderma</i> . ....	54
<b>Tabla 20.</b> Identificación de <i>Pseudomonas fluorescens</i> mediante Microgen <sup>®</sup> ™.....	58
<b>Tabla 21.</b> Análisis de TPH de los tratamientos. ....	58

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Clasificación química de los hidrocarburos .....	6
<b>Figura 2.</b> Respiración aeróbica y respiración anaeróbica, para <i>Trichoderma</i> .....	14
<b>Figura 3.</b> Vía glucolítica para metabolización de los carbohidratos <i>Trichoderma</i> ....	15
<b>Figura 4.</b> Vías de Embden Meyerhof Parnas y Entner-Doudoroff . .....	19
<b>Figura 5.</b> Vía glucolítica para la degradación de hidratos de carbono.....	19
<b>Figura 6.</b> Esquema de la ruta de degradación aeróbica del n-octano.....	21
<b>Figura 7.</b> Diseño experimental DBCA de las 16 cajas de los tratamientos .....	36
<b>Figura 8.</b> Fotografías macroscópicas del hongo en medio PDA a 25 °C.....	52
<b>Figura 9.</b> Fotografías macroscópicas de <i>Trichoderma</i> por fuentes bibliográficas....	52
<b>Figura 10.</b> Fotografías tomadas en el laboratorio con lente 40 X.....	55
<b>Figura 11.</b> Imágenes microscópicas de <i>Trichoderma</i> por H. Barnett .....	55

## Índice de fórmulas

<b>Fórmula 1.</b> Proceso de biorremediación .....	11
<b>Fórmula 2.</b> Conteo de esporas por mL .....	33
<b>Fórmula 3.</b> Cálculo del porcentaje de humedad mediante crisoles .....	39

## **Índice de anexos**

<b>Anexo 1.</b> Resultados de los análisis físico químicos y TPH.....	71
<b>Anexo 2.</b> Procedimientos para análisis físicos químicos, TPH y agares .....	89
<b>Anexo 3.</b> Fotografías del proyecto.....	100
<b>Anexo 4.</b> Datos de variables .....	104

## Resumen

En la presente investigación se evaluó el poder biorremediador del hongo *Trichoderma* sp y la bacteria *Pseudomonas fluorescens* en un suelo contaminado por hidrocarburos, con el objetivo de disminuir los TPH (hidrocarburos totales policíclicos) en el suelo. Este proyecto se efectuó en dos fases: la fase de campo consistió en el muestreo de suelo y la fase de laboratorio consistió en la instalación del ensayo con un sistema DBCA de 4 tratamientos, (T0: Suelo testigo, T1: Suelo + *Trichoderma* sp, T2: Suelo + *Pseudomonas fluorescens* y T3: Suelo con *Trichoderma* sp + *Pseudomonas fluorescens*) y 4 repeticiones con condiciones ambientales controladas como: pH, temperatura, conductividad eléctrica y humedad; se realizaron los análisis físico químicos y TPH al inicio y al final del ensayo durante 3 meses.

El suelo al inicio del ensayo presentó macro y micro elementos indispensables para que los microorganismos puedan degradar los hidrocarburos. La contaminación con TPH inicial en el suelo fue 42070.3 mg/kg, al final del ensayo los tratamientos T1, T2 y T3 obtuvieron una remediación eficaz, situándose dentro de los límites permisibles del RAHOE (reglamento ambiental de actividades hidrocarburíferas); se demostró que los tratamiento funcionan de forma independiente y en consorcio, siendo el T3 (consorcio) el cual degradó más cantidad de hidrocarburo llegando a 379.2 mg/kg, debido a que ambos microorganismos gozan de los mecanismos necesarios para degradar las moléculas de hidrocarburos, demostrándose que la biorremediación es una proceso ecológico y efectivo para la degradación de hidrocarburos.

**Palabras Clave:** microorganismos, hidrocarburo, biorremediación, metabolismo.

## Abstract

The aim of this research was evaluate the power of bioremediation of the fungus *Trichoderma* sp and the bacteria *Pseudomonas fluorescens* in a sample of soil contaminated by hydrocarbons, in order to reduce the TPH (total polycyclic hydrocarbons) in soil. This project was completed in two phases: the field work consisted of soil sampling and the laboratory work consisted of installation of an assay with a DBCA system with 4 treatments (T0: control soil, T1: Soil + *Trichoderma* sp, T2: Soil + *Pseudomonas fluorescens* and T3 : Soil with *Pseudomonas fluorescens* + *Trichoderma* sp ) and 4 repetitions with controlled environmental conditions such as pH, temperature, electrical conductivity and moisture; the physico-chemical and TPH analyzes was performed at beginning and end of the assay for 3 months.

The soil at beginning of the assay had macro and micro elements which are essential for microorganisms to degrade hydrocarbons. The initial TPH contamination in soil was 42070.3 mg / kg, and at the end of the assay the T1, T2 and T3 obtained an effective remediation, settling down within the permissible limits of RAOHE (environmental regulations hydrocarbon activities); demonstrating that all treatments work independently and in a consortium. The T3 (consortium) was the treatment that degraded more amount of hydrocarbons with a value of 379.2 mg / kg, the reason was because both microorganisms had the necessary mechanisms to degrade the hydrocarbon molecules, showing that bioremediation is an ecological and effective process for the degradation of hydrocarbons.

**Keywords:** microorganisms, hydrocarbon, bioremediation, metabolism.

## Introducción

Desde que se descubrieron los hidrocarburos, su uso en las industrias ha provocado impactos ambientales severos, los cuales han venido presentándose de manera muy frecuente en varias partes del mundo, asociándose con la producción de residuos, generación de sustancias nocivas y otras operaciones, ocasionando desequilibrios en el ecosistema que impactan de manera perjudicial el entorno ecológico; la contaminación producida por TPH (Hidrocarburos Totales Policíclicos) depende de la mezcla de hidrocarburos que se encuentra en el petróleo, además de factores ambientales de la zona en la cual existe la contaminación (Agency for toxic substances and disease registry, 1999). Desde una perspectiva edafológica, un suelo contaminado es aquel que muestra particularidades alteradas anteriormente por sustancias cuya mano del hombre ha intervenido (Real decreto 9, 2005). Debido a que los hidrocarburos poseen propiedades físicas y químicas dañinas, provocan cambios en las condiciones del suelo, causando la mortalidad de la microbiota autóctona del suelo, cambiando totalmente su comportamiento y su estructura (Martínez & López, 2001) (Buendía , 2012) (Bravo, 2007).

Muchas tecnologías o tratamientos físico-químicos que se utilizan para solucionar el problema de la contaminación de suelos por petróleo son muy condicionadas y han demostrado ser demasiado costosas y parcialmente efectivas, perjudicando aún más, ya que arrojan vestigios de sustancias xenobióticas nocivas alterando su composición, convirtiéndolo en un suelo cansado y su remediación tome varios años en recuperar su vitalidad (Volke, 2002, pág. 25).

Existen alternativas biológicas que han demostrado tener el potencial remediador apto para tratar estos problemas medio ambientales, pero al tratarse de una tecnología con una eficiencia incierta, no es utilizada con mucha confianza por algunos factores como:

economía variada, lenta difusión, y en ocasiones no es empleada debido a que empresas e instituciones intermediarias que por motivos políticos o ambientales recurren a tecnologías físico-químicas (Acuña , Aguilera, & Aguayo, 2003).

Las moléculas que conforman el petróleo son altamente complejas, por lo cual se pretende atenuar este problema mediante la aplicación de la biorremediación; los microorganismos (hongos, bacterias) tienen la habilidad de interactuar tanto física como químicamente con compuestos artificiales y naturales llevando a un cambio estructural o la degradación completa de la molécula contaminada (Semple, Rcid, & Fermor, 2001, págs. 270-271).

Es una técnica limpia, no muy costosa, accesible y en algunas ocasiones no requiere de sustancias adicionales, por su composición, las moléculas de los hidrocarburos resultan ser una excelente fuente de carbono y energía, lo que posibilita el desarrollo de los microorganismos al metabolizar estos compuestos tóxicos (Abad, 2008, págs. 7-9). La biodegradabilidad de los hidrocarburos es un proceso complejo, con períodos de tiempo prolongados y con dependencia de varios factores, pero como resultado final se tiene un producto descontaminado y sin vestigios de otras sustancias añadidas (químicos) (Abad, 2008, págs. 7-9).

*Pseudomonas* sp, es un bacilo gram negativo aeróbico, se lo puede encontrar en ecosistemas terrestres y acuáticos, posee la capacidad de alimentarse con sustratos de origen orgánico y en algunos casos con compuestos muy tóxicos a demás es uno de los pocos organismos capaces de degradar compuestos como alcanos de cadena ramificada con la producción de biosurfactantes (Ron & Rosenberg, 2002, págs. 249-251). Esta bacteria utiliza la ruta aeróbica como la más común, la cual consiste en la oxidación del anillo bencénico por parte de dioxigenasas con el objetivo de formar dihidrodioles que se dehidrogenarán para formar dihidroxilados, los cuales pueden ser

metabolizados vía catecoles que después de pasar por un metabolismo previo se convertirán en CO<sub>2</sub> y agua (Lladó, 2012, pág. 34) (Maposita, Calle, Fiallos, & Burgos, 2014, págs. 2-3) (Argumendo, Alarcón, Ferrera, & Peña, 2009, págs. 258-264).

*Trichoderma* sp, es un hongo filamentoso que habita en ecosistemas terrestres y acuáticos, tienen la habilidad de adaptarse y colonizar de manera eficaz y oportuna distintos ambientes gracias a su alta capacidad reproductiva, tomando en cuenta que pueden tolerar diferentes factores climáticos; su destreza para desarrollarse es alta debido a que no requieren de altos índices de nutrimentos, son considerados oportunistas; estudios anteriores reportaron la capacidad que poseen para degradar hidrocarburos para tener como resultado una destoxificación significativa (Castro & Rivillas, 2012, págs. 7-14) (Argumendo, Alarcón, Ferrera, & Peña, 2009, págs. 258-264).

Como se menciona en el Plan Nacional del Buen Vivir “El derecho a vivir en un ambiente sano y libre de contaminación, tiene como prioridades la conservación y el uso de sus recursos naturales, la inserción de tecnologías ambientalmente limpias, prevención, control y la mitigación de la contaminación” (Ministerio del Interior, 2013, pág. 322).

El proyecto tiene como objetivo general evaluar la eficacia de *Trichoderma* sp y *Pseudomonas* sp para biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Los objetivos específicos son: analizar parámetros físico-químicos del suelo en estudio al inicio y al final de la investigación, evaluar mediante los análisis respectivos la cantidad de TPH en el suelo y determinar cuál de los tratamientos es el mejor para la biorremediación de hidrocarburos.

Se plantea dos hipótesis, la nula ( $H_0$ ) que indica que la aplicación de *Trichoderma* sp y *Pseudomonas* sp no favorecerá a la degradación de hidrocarburos presentes en el suelo, y la hipótesis alternativa ( $H_A$ ) expone que la aplicación de *Trichoderma* sp y *Pseudomonas* sp favorecerá a la degradación de hidrocarburos presentes en el suelo.

El ensayo se desarrolló en dos fases: la fase de campo consistió en la toma de muestras de suelo provenientes de Puenbo; la fase de laboratorio se realizó en 3 laboratorios; (1) laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana (UPS) en donde se aisló e identificó *Trichoderma* sp y *Pseudomonas fluorescens*, además se estableció el ensayo de biorremediación, el cual consistió en un diseño experimental DBCA (diseño de bloques completos al azar) constituido por 4 tratamientos; T0 (suelo testigo), T1 (suelo + *Trichoderma* sp), T2 (suelo + *Pseudomonas fluorescens*) y T3 (suelo + *Pseudomonas fluorescens* + *Trichoderma* sp) con 4 repeticiones respectivamente; (2) en los laboratorios de Agua y Suelos de la UPS sede Cayambe en donde se realizaron los análisis físico-químicos de cada uno de los tratamientos y finalmente en los laboratorios del Centro de soluciones analíticas integrales CENTROCESAL (3) en donde se efectuaron los análisis de TPH de los tratamientos.

Durante el ensayo se midieron variables como; temperatura, pH, conductividad eléctrica y humedad, las cuales se utilizaron para un análisis de varianza (ANOVA) y Tukey al 5% mediante el programa "stadistick";

Para los análisis físico-químicos y TPH se utilizaron los resultados realizados al inicio y al final del ensayo.

## Capítulo 1

### Marco conceptual

#### 1.1. Petróleo

Es una sustancia natural no renovable, que se desarrolla por la degradación anaeróbica de componentes orgánicos por extensos periodos de tiempo y ciertas condiciones ambientales; está formada por una mezcla de hidrocarburos aromáticos, parafínicos y naftalénicos, entre otros elementos no hidrocarbonados que se encuentran en mínimas cantidades (Gavilánez, 2013, pág. 7).

La composición aproximada del crudo es: Carbono: 84-87 %, Hidrógeno: 11-14 %, Oxígeno: 0-1 %, Nitrógeno: 0-3 % Azufre: 0.2-5 % y otros elementos en menor cantidad, esta proporción varía según su origen y el yacimiento de cual fueron extraídos (Gary & Handwerk, 1980, págs. 19-23) (Gavilánez, 2013, pág. 8).

##### 1.1.1. Clasificación del petróleo.

El petróleo se clasifica de acuerdo a: su naturaleza química, su densidad grados API (American Petroleum Institute) y su contenido de azufre (Kraus, 2012) (Instituto Ecuatoriano de Normalización, NTE INEN 2 341:2003, 2003) (Instituto Ecuatoriano de Normalización, NTE INEN 2 319:2001, 2001).

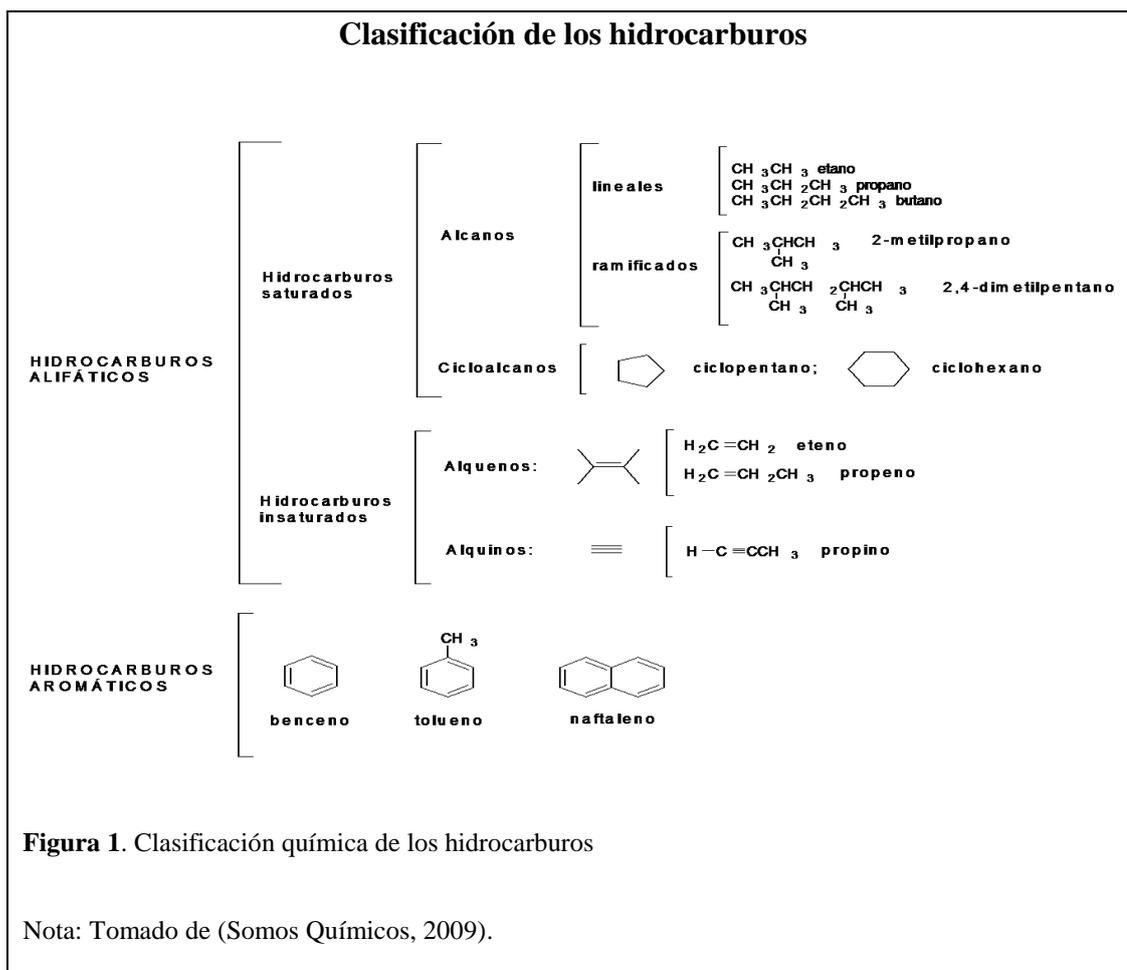
##### 1.1.2. Impactos en el suelo por el petróleo.

La adición de petróleo al suelo provoca que la cantidad de carbono se acreciente, provocando que las relaciones C/N y C/P aumente de manera descomunal (Pardo, Perdomo, & Benavides, 2004), “debido a la elevada salinidad que presenta el petróleo, provoca altas gradientes pudiendo llegar a ocasionar la destrucción de la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células” (Benavides López de Mesa, y otros, 2006, pág. 83). En cuanto al potencial de hidrógeno (pH)

disminuye por consecuencias del acaparamiento del carbono orgánico y la formación de ácidos orgánicos; aumento de Mn y Fe intercambiable (Castro G. , 2009, págs. 12-13) (Bravo, 2007, pág. 4).

## 1.2. Hidrocarburos

Es un compuesto orgánicos constituido por C e H, puede presentarse en forma gaseosa, líquida o sólida; los alcanos son la fuente más importante del petróleo, estas moléculas pueden poseer reactividades químicas como tóxicos o explosivos (Gómez, y otros, 2000, pág. 2) (Autino, Romanelli, & Ruíz, 2013). Se clasifica dependiendo el tipo de enlace que presenta la molécula de carbono en la estructura de los hidrocarburos (Tulas, Libro VI, anexo 2, 2012).



### 1.2.1. Hidrocarburos totales policíclicos (TPH).

“El termino TPH se usa para describir a un grupo extenso de varios cientos de sustancias químicas derivadas originalmente del petróleo crudo, se define como la cantidad medible de hidrocarburos a base de petróleo” (Agency for toxic substances and disease registry, 1999, pág. 1).

Las sustancias que contienen TPH envuelven varios tipos de mezclas, formados por hidrocarburos alifáticos (cadena de carbono lineal) y compuestos aromáticos (anillo de carbono) (Agency for toxic substances and disease registry, 1999, págs. 1-2).

Para el cálculo de TPH se recurre a métodos analíticos (espectroscopia IR, gravimétrico, cromatografía de gases) (Servicios Analíticos Generales S.A.C., 2016).

**Tabla 1.** Criterios de remediación o restauración de suelos.

Hidrocarburo	Unidades (Concentración en Peso Seco)	USO DEL SUELO			
		Agrícola	Residencial	Comercial	Industrial
Hidrocarburos Aromáticos Monocíclicos					
Benceno	mg/kg	0.05	0.5	5	5
Etilbenceno	mg/kg	0.1	1.2	20	20
Estireno	mg/kg	0.1	5	50	50
Tolueno	mg/kg	0.1	0.8	0.8	0.8
Xileno	mg/kg	0.1	1	17	20
Compuestos Fenólicos	mg/kg	-	-	-	-
Clorofenoles (cada uno)	mg/kg	0.05	0.5	5	5
Fenoles (total)	mg/kg	3.8	3.8	3.8	3.8
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	mg/kg	-	<2	<5	<1
Benzo(a)antraceno	mg/kg	0.1	1	1	1
Benzo(a)pirenos	mg/kg	0.1	0.7	0.7	0.7
Naftaleno	mg/kg	0.1	0.6	22	22
Pirenos	mg/kg	0.1	10	10	10

Nota: Tomado de (Tulas, Libro VI, anexo 2, 2012, págs. 364-366).

### **1.3. Suelo**

“Medios porosos formado en la superficie terrestre mediante el proceso de meteorización por largos periodos, aportados por los fenómenos biológicos, geológicos e hidrológicos” (Tulas, Libro VI, anexo 2, 2012, pág. 349).

Constituido por minerales, materia orgánica, microorganismos, vegetales, animales, aire y agua, sirve como soporte de vida en la cual pueden interactuar materias orgánicas e inorgánicas, flora, fauna y multitud de microorganismos, posee propiedades físicas y químicas que proporcionan información y características adecuadas del suelo en cada región específica (FAO, 2013) (Cando, 2011, págs. 7-8).

### **1.4. Biorremediación**

La técnica de biorremediación radica en el uso de microorganismos (autóctonos o exógenos) como bacterias, hongos, plantas, algas entre otros, con potenciales metabólicos capaces de desintoxicar o neutralizar ciertos materiales tóxicos de un ambiente, transformándolos en sustancias menos tóxicas, capaces de eliminarlas por métodos más factibles, es una técnica que aumenta los niveles aeróbicos de la degradación, el cual es un proceso natural del suelo (Benavides López de Mesa, y otros, 2006, pág. 84) (Lladó, 2012, pág. 35) (Gaviláñez, 2013, pág. 14). El resultado final del proceso de biodegradación se puede presentar de 3 formas: (a) un cambio simple en la molécula madre, pero sin alterar su estructura principal, (b) la molécula se descompone en distintas moléculas, pero al unir todas sus partes, tiene como resultado la molecular original, (c) la descomposición total de las moléculas orgánicas originales dando como resultado formas minerales (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2009, pág. 1075).

**Tabla 2.** Tipos de biorremediación.

<b>TIPO</b>	<b>DEFINICIÓN</b>
<b>Fitorremediación</b>	Utiliza plantas para remover, absorber y tolerar altas tasas de materiales tóxicos para descontaminar y limpiar ambientes.
<b>Micorremediación</b>	Emplea hongos capaces de degradar sustancias toxicas, estos organismos pueden ser autóctonos o exógenos del lugar.
<b>Ficorremediación</b>	Remoción de contaminantes mediante el uso de algas.
<b>Degradación Enzimática</b>	Usa enzimas producidas por ciertos organismos anticipadamente, para la degradación de sustancias nocivas.

Nota: Adaptado de (ArgenBio , 2007) (Morales, 2014) por S. Muñoz, 2016.

**Tabla 3.** Requerimientos para la biorremediación.

<b>Requerimientos Microbianos</b>	Fuente de alimento o carbono, aceptores y donadores de electrones, nutrientes (N, P, S, Mg, K, Ca, Mn, Zn, Cu, Zn), elementos traza.
<b>Requerimientos Geográficos</b>	Examinación del tipo y número de colonias existentes en el lugar, aptos para biorremediación , condiciones geológicas y geoquímicas, presencia de otro elemento contaminante al que se quiere remediar, la cantidad suficiente de oxígeno, compuestos utilizados como aceptores de electrones (biorremediación anaerobia) entre otros.
<b>Otros Requerimientos</b>	Humedad necesaria y dentro de los parámetros adecuados para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, pH adecuado, temperatura, propiedades del suelo, tipo de hidrocarburo

Nota: Adaptado de (Buendía , 2012, págs. 15-18) (Ñustez, 2012, pág. 23) por S. Muñoz, 2016.

### 1.4.1. Biorremediación de petróleo en el suelo.

La biorremediación de suelos contaminados por petróleo utiliza dos métodos alternativos: métodos aerobios o anaerobios, pero la mayoría ocurre por degradación aeróbica, pero no todos los hidrocarburos se someten al proceso de degradación de la misma manera, debido a que los hidrocarburos no contienen moléculas iguales (Castillo Rodríguez, y otros, 2005, pág. 426), pero estos procesos necesitan de varios requerimientos (Ver tabla 3), para cada caso de biorremediación se necesita algunas estrategias las cuales se dividen en *in situ* y *ex situ* (Ver tabla 4).

**Tabla 4.** Estrategias de biorremediación.

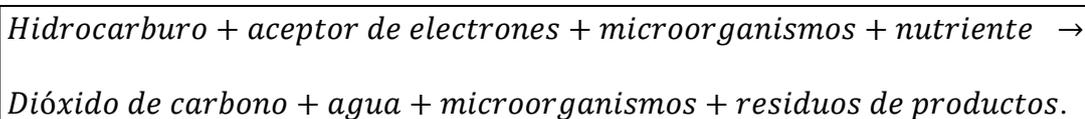
<i>In situ</i>	
Es una técnica que se la realiza en el lugar de la contaminación, radica en la utilización de microorganismos propios de la zona o externos a ella, la finalidad de esta técnica es la de potenciar la degradación natural de la región mediante la adición de nutrimentos y oxígeno.	
<b>Bioaireación</b>	Es la adición de O <sub>2</sub> al suelo con el objetivo de estimular a los microorganismos para ayudar al proceso natural de remediación, es una técnica factible y de bajo costo.
<b>Bioestimulación</b>	Es una técnica que consiste en estimular al suelo con la añadidura de ciertos factores como: nutrientes, oxígeno molecular, niveles de humedad, aceptores de electrones, que permiten la estimulación de los microorganismos para que contribuyan al proceso de degradación natural.
<b>Bioaumentación</b>	Es la adición de cultivos microbianos vivos específicos previamente obtenidos con características biorremediadoras relacionadas al sitio contaminado para acelerar el proceso de remediación en un corto tiempo.

<i>Ex situ</i>	
Si el tratamiento es efectuado fuera de la zona se lo conoce como ex situ, son técnicas que se utilizan para tratar lugares contaminados los cuales no se pueden biorremediar mediante técnicas <i>in situ</i> .	
<b>Compostaje</b>	Es un proceso biológico controlado confinado, se trata de la oxidación biológica de una mezcla de ingredientes como: materia orgánica, estiércol y suelo, gracias a la ayuda de microorganismos degradadores cuya función es mejorar la estructura del suelo y dar los nutrientes necesarios.
<b>Biorreactores</b>	Es un depósito en el cual suceden una serie de reacciones biológicas por la acción de microorganismos o enzimas; es una técnica que utiliza la descomposición biológica para producir el crecimiento de microorganismos específicos para reducir los contaminantes que se encuentran en el sitio contaminado.

Nota: Adaptado de (Cando, 2011, págs. 64-69) (Ñustez, 2012, págs. 20-22) (Espinoza, 2009, págs. 38-48) (Meneses, 2014, pág. 2) (Vega, 2011, pág. 20) (Gavilánez, 2013, pág. 14) (Rivera, 2011, págs. 35-36) (Alegria, 2013) (Agudelo, 2010, pág. 61) por S. Muñoz, 2016.

#### 1.4.2. Microorganismos para biorremediación de petróleo en suelos.

Según Norris, et al (1993) la biorremediación de hidrocarburos se puede expresar:



**Fórmula 1.** Proceso de biorremediación

El suelo es el hábitat óptimo de varios microorganismos se definen por presentarse en magnánimas cantidades y variedades, se caracterizan por poseer un potencial de biorremediación efectivo para solucionar problemas de contaminación en suelos;

bacterias y hongos ejercen una función de gran importancia en el proceso de biorremediación (Lladó, 2012, págs. 34-35) (Cando, 2011, págs. 6-7).

#### 1.4.2.1. Hongos con potencial biorremediador.

Son organismos descomponedores primarios, poseen la cualidad de crear enzimas con habilidades especiales para la descomposición y mineralización de compuestos altamente complejos, además son capaces de liberar exoenzimas hidrolíticas encargadas de la digestión de sustratos externos (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2009, pág. 632), degradan materia orgánica del ambiente para convertirlos en compuestos menos complejos o moléculas inorgánicas, para así utilizarlos en fuentes de energía para su metabolismo; son organismos capaces de llevar ciertos materiales hasta CO<sub>2</sub> y agua, son organismos capaces de penetrar en suelos contaminados gracias a sus hifas que les ayudan a infiltrarse en lugares contaminados (Déley, 2010, págs. 19-20) (Yañez & Wong, 2013, pág. 13).

**Tabla 5.** Géneros de hongos utilizados para la biorremediación de suelos

<i>Allescheria</i>	<i>Debaromyces</i>	<i>Mucor</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Oidiodendrum</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Trichosporon</i>
<i>Candida</i>	<i>Gonytrichum</i>	<i>Phacelomyces</i>	<i>Saccharomycopsis</i>	
<i>Cephalosporium</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Phialophora</i>	<i>Scopulariopsis</i>	
<i>Cladosporium</i>	<i>Helminthosporium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Sporobolomyces</i>	
<i>Cunninghamella</i>	<i>Mucor</i>	<i>Rhodosporidium</i>	<i>Torulopsis</i>	

Nota: Tomado de (Aycachi, 2008, pág. 16).

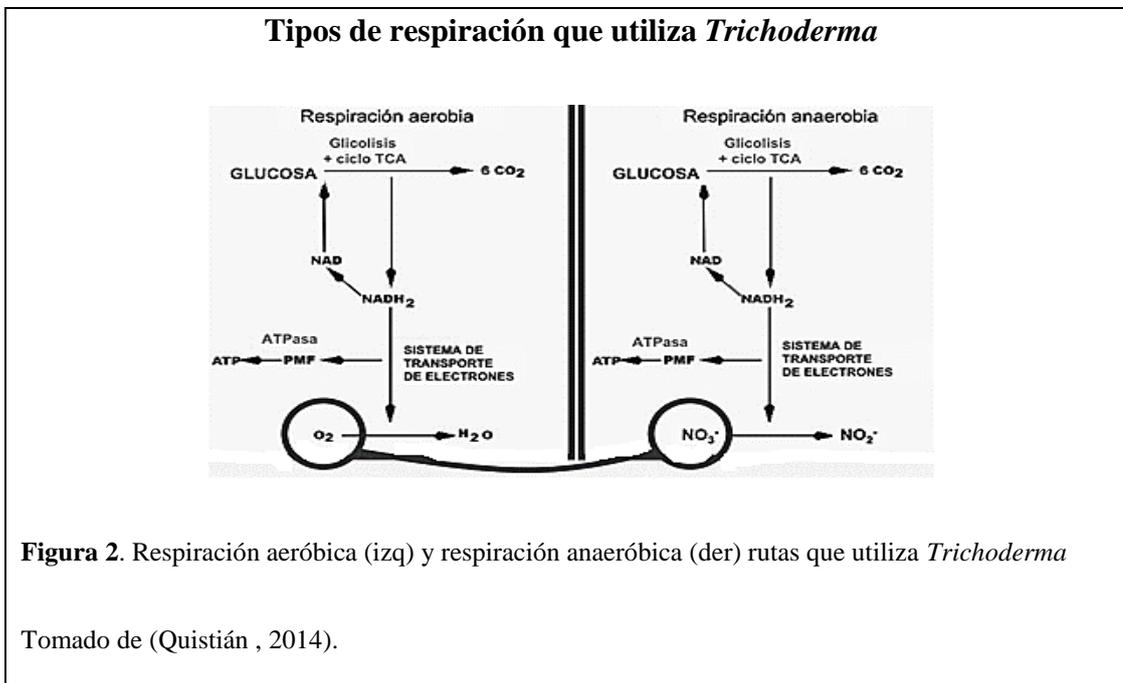
##### 1.4.2.1.1. *Trichoderma* sp.

*Trichoderma* sp pertenece al reino Fungi, división Eumycota, sub división Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, orden Hyphales (Moniliales), familia

Moniliaceae, género *Trichoderma* (Argumendo, Alarcón, Ferrera, & Peña, 2009, pág. 257), es un hongo filamentoso aerobio facultativo, se caracteriza por poseer conidióforos erectos o arrastrados muy ramificados de forma cónica, en los extremos del conidióforo presenta terminaciones hialinas, posee esporas lisas con un solo núcleo ovoides, producen clamidiosporas globosas ubicadas en las terminaciones finales de las hifas (Barnett, 1967, págs. 52-53); son organismos oportunistas, utilizan la materia orgánica para su crecimiento, gozan de una facultad de esporulación lo que le permite reproducirse de manera rápida, esto es favorable debido que les permite colonizar y adaptarse a diferentes tipos de ambientes; la temperatura para su crecimiento oscila entre 15 y 30 ° C siendo su óptima 25 ° C; con respecto a su humedad varia de 20 % a 80 % para su crecimiento, y su pH fluctúan 5.5-7.5 siendo el mejor 6.6 (Castro & Rivillas, 2012, págs. 5-6).

Poseen 3 tipos de mecanismos de acción: micoparasitismo, en donde tiene un efecto antagónico sobre un hongo fitopatógeno, degradándolo completamente, antibiosis: es la producción de metabolitos secundarios tóxicos los cuales tiene un efecto adverso frente a otros microorganismos, finalmente la competencia: que consiste en la disputa por los nutrientes para su crecimiento (Infante, Martínez, González , & Reyes, 2009, págs. 14-19) (Castro & Rivillas, 2012, págs. 6-9). Son hongos que pueden encontrarse formando consorcios o como parásitos de otros organismos (Osorio, 2010, pág. 36) (Argumendo, Alarcón, Ferrera, & Peña, 2009, pág. 258) (Castro & Rivillas, 2012, págs. 5-7). Su metabolismo consiste en dos rutas metabólicas: (a) función anabólica con el propósito de sintetizar constituyentes estructurales, la ruta tiene como propósito la propagación y desarrollo celular, compuesto por rutas metabólicas bioquímicas, incluyendo la elaboración de metabolitos primarios, formados en la fase exponencial,

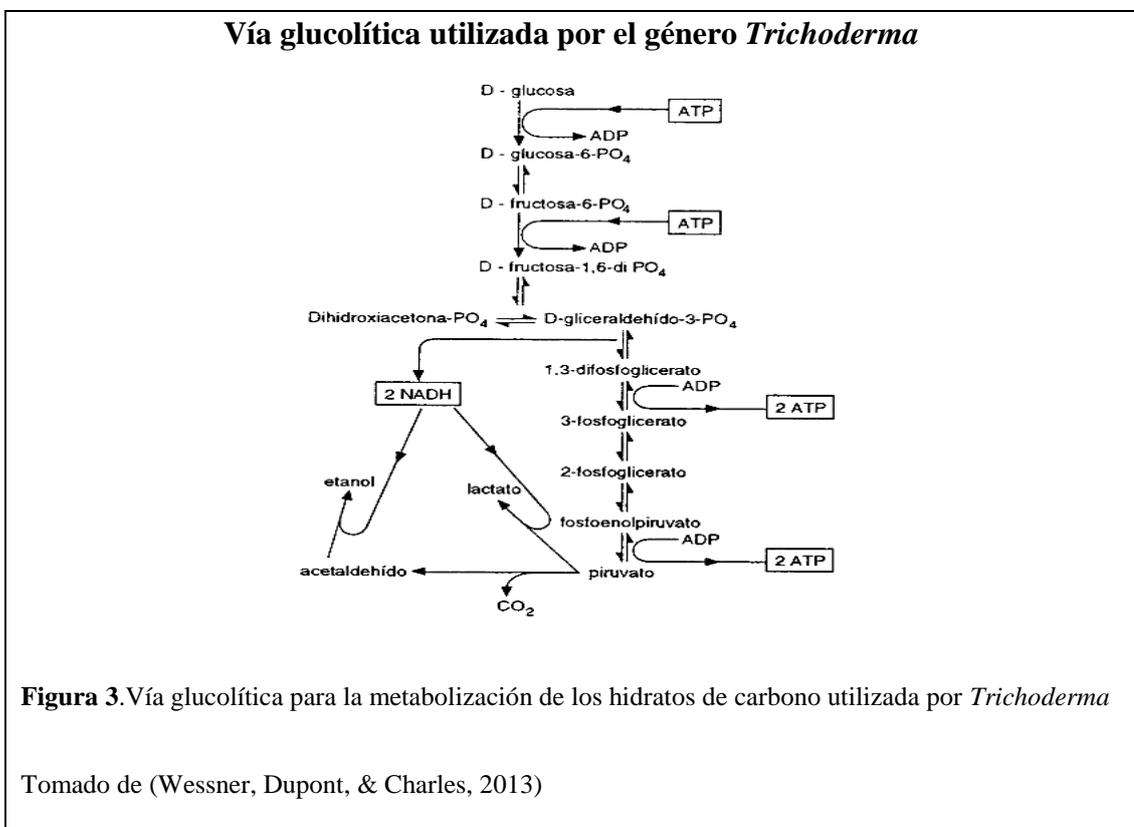
todo esto enfocado a la adquisición de energía, reproducción celular y su viabilidad (Wessner, Dupont, & Charles, 2013).



El género *Trichoderma* utiliza la vía glucolítica para la metabolización de los hidratos de carbono y así conseguir la energía necesaria para realizar los procesos metabólicos; el primer paso del metabolismo de la glucosa es su transporte al interior de la célula; este transporte en *Trichoderma* está mediada por sensores y por un sistema de transporte activo; una vez que la glucosa esté en el interior de la célula, esta debe de ser fosforilada por hexoquinasas o glucoquinasas (Gupta, y otros, 2014, pág. 368) y (b) función catabólica para extraer energía de los nutrientes, la ruta está asociada a la creación de metabolitos secundarios forjados en las rutas bioquímicas heterogéneas (derivados de metabolismo primario) como por ejemplo: (a) productos derivados de glucosa como es la formación de antibióticos, (b) productos relacionados con los nucleósidos, que mediante la vía de la pentosa fosfato forma ribosa para sintetizar nucleósidos, (c) productos derivados de la vía shikimato-corismato formando el ácido shikimico , (d) vía del policétido (e) formación de terpenos y esteroides y (f) productos

procedentes de aminoácidos (Wessner, Dupont, & Charles, 2013) (Gamazo, Sánchez, & Camacho, 2013).

“La producción de metabolitos secundarios varía según el compuesto específico, la cepa de *Trichoderma*, la presencia de otros microbios, y el equilibrio entre las tasas de biosíntesis y de biotransformación elicidadas” entre los metabolitos secundarios se encuentran: dermadin, harzianolide, harzianopyridone, alamethicins acid koningic entre otros (Gupta, y otros, 2014, págs. 369-370).



Los hidrocarburos son compuestos altamente complejos, la estructura del hidrocarburo y la temperatura a la que son expuestos influencia en el proceso de degradación, ciertos estudios demostraron que varios géneros de *Trichoderma* (*T. koningii* y *Trichoderma* sp) utilizados para biorremediación especialmente de moléculas de hidrocarburos saturados y aromáticos presentes en ciertos aceites y combustibles tuvieron una biorremediación eficaz, donde se los evaluó al exponer a compuestos hidrocarburos

saturados (hexadecano) y aromáticos (tolueno, fenol, naftaleno entre otros (Argumendo, Alarcón, Ferrera, & Peña, 2009, págs. 259-262). Algunos hongos son capaces de degradar ciertos compuestos del crudo, pero con la ayuda de ciertas enzimas que facilitan el proceso como son, citocromo intracelular P450 y los extracelulares lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa, compuestos necesarios para la biodegradación de HAPs, los hongos son capaces de mineralizar HAPs de más de 4 anillos aromáticos (Lladó, 2012, págs. 34-35).

#### **1.4.2.2. Bacterias con potencial biorremediador.**

Son microorganismos que se encuentran en gran cantidad y de diferentes variedades, algunas son simbioses de plantas, o como parásitos intracelulares de otros organismos o pueden formar consorcios con otros microorganismos; por sus características presenta diversas variaciones en sus propiedades anatómicas, ecológicas y funcionales, son los principales descomponedores de materia orgánica en el suelo (Torres & Zuluaga, 2009, págs. 42-43) (Meneses, 2014, pág. 34).

Bacterias como *Bacillus subtilis* o *Pseudomonas* entre otras tienen la habilidad de formar sus propios surfactantes que son compuestos químicos anfipáticos capaces de disminuir la tensión superficial de algunas sustancias, para su uso dependen de varios factores como; fisiología de las bacterias, composición de la molécula de petróleo y el entorno ambiental en que se encuentra el contaminante; los biosurfactantes, que son los surfactantes sintetizados por las propias bacterias, tienen la función de mejorar la biodisponibilidad de ciertas sustancias hidrófobas, ya que estas sustancias no se encuentran disponibles para asimilarlo debido a que poseen una baja solubilidad acuosa o están adheridos fuertemente al suelo y no son aptos para que las bacterias puedan usarlo para su desarrollo, el biosurfactante ayuda a mejorar la biodisponibilidad de dos maneras: una con el aumento de rapidez en la que pueden

diluirse algunas partículas de hidrocarburo mediante su separación por las micelas y la otra por la influencia de la dilución que puede causar el surfactante en contacto con la superficie del compuesto; es por estas razones que ciertos microorganismos poseen y recurren a esta propiedad, de este modo ayuda a aumentar la biodisponibilidad del sustrato a utilizar, por lo que beneficia a la biorremediación, debido a que mientras un contaminante se encuentra más biodisponible, más alto es el crecimiento de los microorganismos y por lo tanto más altas son las probabilidades de biorremediación (Riojas, Torres, Mondaca, Balderas, & Gortáres, 2010, págs. 124-128).

**Tabla 6.** Géneros de bacterias utilizadas para la biorremediación de suelos

<i>Achrornobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Actinomyces</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Brevebacterium</i>	<i>Coryneformes</i>
<i>Erwinia</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Klebsiella</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Leumthrix</i>	<i>Moraxella</i>
<i>Nocardia</i>	<i>Peptococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Sarcina</i>	<i>Spherotilus</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Xanthomyces</i>

Nota: Tomado de (Aycachi, 2008, págs. 15-16).

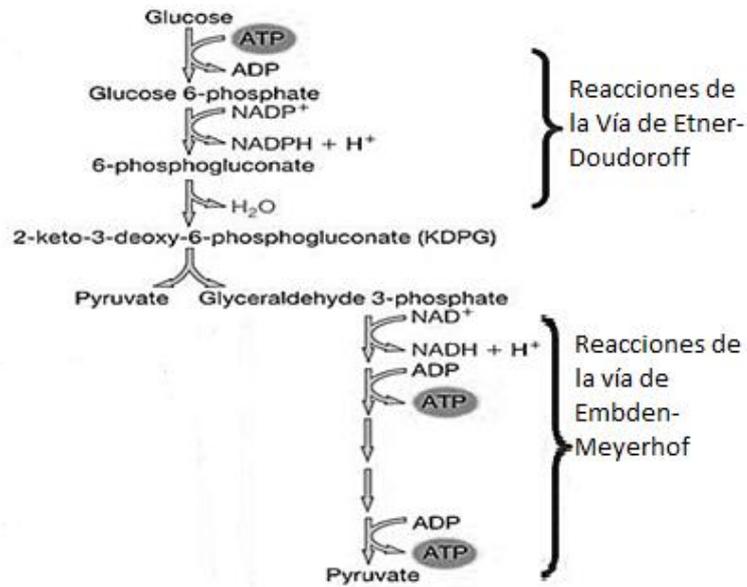
#### 1.4.2.2.1. *Pseudomonas* sp.

Es una bacteria perteneciente al reino Bacteria, filo proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, orden pseudomonadales, familia Pseudomonadaceae, género *Pseudomonas*, contienen bacilos rectos o curvados, esporulados, mesófilos y con flagelación polar, con medidas de: 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  x 1.5 a 5  $\mu\text{m}$ ; generalmente tienen un metabolismo a base de oxígeno (aerobias), pero en ocasiones utilizan el nitrato como

aceptor final en la respiración anaerobia; las *Pseudomonas* pertenecen al grupo de los que realizan el ciclo de los ácidos tricarboxílicos con la facultad de que pueden llegar a oxidar sustratos hasta obtener como resultado  $\text{CO}_2$  (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2009, pág. 556). Las bacterias necesitan de algunos requerimientos indispensables como: requerimientos nutricionales:  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$ , S, P, K, Mg, fuente de carbono, dadores y receptores de  $\text{H}_2$ , elementos traza u oligoelementos y elementos esenciales para el crecimiento (vitaminas, aminoácidos, bases nitrogenadas entre otros); requerimientos del medio: pH, temperatura, presión osmótica (Varela, 2011, págs. 1-2).

En las bacterias se hallan 3 vías para la degradación de los hidratos de carbono: la vía glucolítica o de Embden Meyerhof Parnas, la vía de pentosa fosfato, la vía de Entner-Doudoroff, pero para la degradación de la glucosa la *Pseudomonas* utilizan la vía de Entner-Doudoroff como acontece por las vías de las pentosas, donde se forma 1 molécula de ATP, por cada molécula de glucosa degradada (Varela, 2011, págs. 1-2).

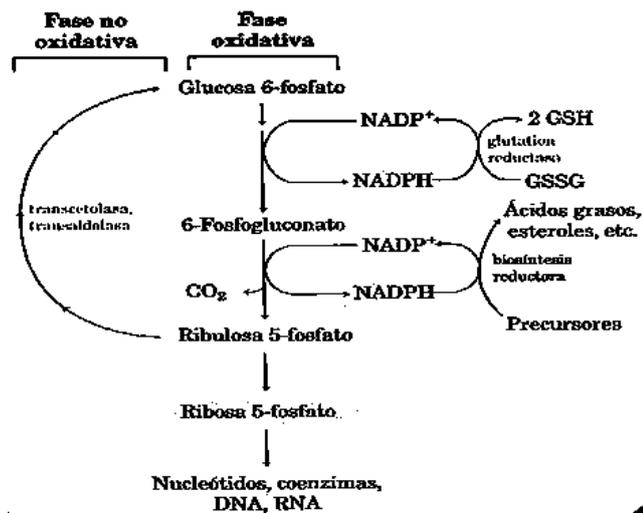
## Reacciones de las vías de Embden Meyerhof Parnas y Entner-Doudoroff



**Figura 4.** Vías de Embden Meyerhof Parnas y Entner-Doudoroff para la degradación de hidratos de carbono.

Tomado de (SlidePlayer, 2015).

## Ruta glucolítica de pentosas fosfato

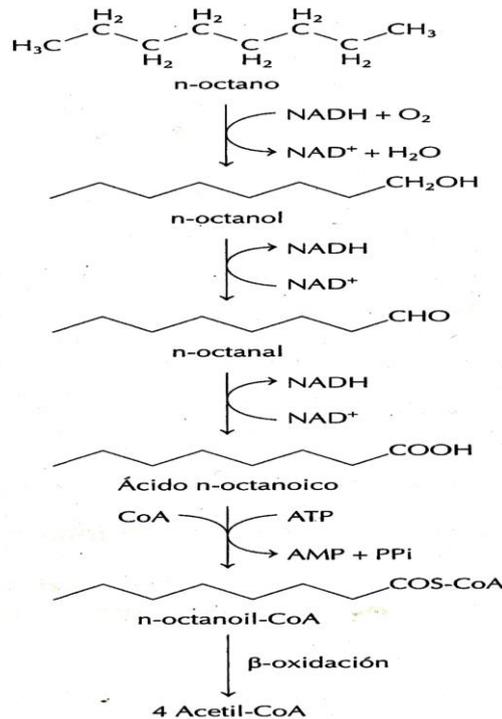


**Figura 5.** Vía glucolítica para la degradación de hidratos de carbono

Tomado de (Vásquez, 2012).

Son bacterias con la capacidad de fabricar biosurfactantes los cuales intervienen en el proceso de extracción de aceites y derivados, facilitan el ingreso de los hidrocarburos por pared celular, además envuelve plásmidos catabólicos con genes, que codifican para enzimas involucradas en la degradación de componentes tóxicos, también poseen operones, transposones y plásmidos que facilitan el traspaso de genes lo que posibilita que se puedan adaptar fácilmente a ambiente contaminados (Gómez, y otros, 2008, pág. 78). Estos microorganismos despliegan actividades de peroxidasas y oxigenasas, desde el punto de vista biotecnológico son organismos capacitados para utilizar ciertos compuestos altamente tóxicos como sustrato para poder desarrollarse, los cuales incluye: compuestos aromáticos, derivados halogenados y otros compuestos orgánicos recalcitrantes, algunos procedentes del petróleo; existen varias especies de *Pseudomonas* que intervienen en el ciclo del carbono en la naturaleza, lo que los hacen organismos versátiles para la degradación de compuestos de alto y bajo peso molecular, en el caso del petróleo; contienen en su membrana citoplasmática ciertas enzimas degradadoras de hidrocarburo (Benavides López de Mesa, y otros, 2006, págs. 86,87) (Bustamante, Suarez, Murillo, & Zuluaga José, 2014, pág. 1) (García & Guerrero, 2004, págs. 27-31). Se ha encontrado el potencial biodegradador de ciertas especies de *Pseudomonas*, la cual tiene la habilidad de degradar compuestos procedentes del petróleo, como son n-alcanos, naftalenos y tolueno, cada una con la ayuda de un plásmido específico como: OCT, NAH y TOL (Castillo Rodríguez, y otros, 2005, págs. 428-429).

### Degradación aerobia de un alcano por *Pseudomonas*



**Figura 6.** Esquema de la ruta de degradación aeróbica del n-octano

Tomado de (Castillo, *et al.*, 2005, pág. 427).

### 1.5. Consorcios microbianos

Un consorcio microbiano es una asociación natural de dos o más poblaciones microbianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo, donde todos se benefician de las actividades de los demás. La asociación refleja estilos de vida sinérgicos o sintróficos en el que el crecimiento y el flujo cíclico de nutrientes se conduce más efectiva y eficientemente que en poblaciones individuales (Montoya & Ochoa, 2010, pág. 60).

En el caso de suelos contaminados, las comunidades microbianas capaces de sobrevivir a estas condiciones son, asociaciones aptas, capaces de tolerar niveles de toxicidad y además de todo esto, ser capaces de beneficiarse de los contaminantes para

poder utilizarlos como fuente de energía para poder crecer y desarrollarse; en suelos contaminados, las cepas que mayores posibilidades tienen de sobrevivir son aquellas que son capaces de soportar los altos niveles de toxicidad y al mismo tiempo apto para utilizar esta sustancia para su crecimiento (Meneses, 2014, págs. 35-36).

## **1.6. Fundamentación Legal**

Para el proyecto se utilizó la reglamentación por parte del RAHOE (reglamento ambiental de actividades hidrocarburíferas) y el TULAS (texto unificado de legislación ambiental secundaria), libro VI del Anexo 2:

Según el (RAHOE) (2010):

### **CAPÍTULO XII: LÍMITES PERMISIBLES**

**Art. 86.-** Parámetros.- Los sujetos de control y sus operadoras y afines en la ejecución de sus operaciones, para descargas líquidas, emisiones a la atmósfera y disposición de los desechos sólidos en el ambiente, cumplirán con los límites permisibles que constan en los Anexos No. 1, 2 y 3 de este Reglamento, los cuales constituyen el programa mínimo para el monitoreo ambiental interno y se reportarán a la Subsecretaría de Protección Ambiental conforme la periodicidad establecida en el artículo 12 de este Reglamento.

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 la misma área.

**Tabla 7.** Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicio.

<b>Parámetro</b>	<b>Expresado en</b>	<b>Unidad</b>	<b>Uso Agrícola</b>	<b>Uso Industrial</b>	<b>Ecosistemas sensibles</b>
Hidrocarburos totales	TPH	mg/kg	<2500	<4000	<1000
HAP	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

Nota: 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. Fuente: (Ministerio de Hidrocarburos, 2010). Tomado de (Tulas, Libro VI, anexo 2, 2012)

#### Tratamientos Biológicos:

Literal 4.1.3.7 Independiente del tratamiento que el regulado adopte, los suelos contaminados deberán alcanzar los niveles de concentración establecidos en los criterios de remediación de suelos establecidos (tabla 2) en la presente Norma. Los valores serán aplicados de acuerdo al uso de suelo donde se sitúa el área contaminada.

#### 4.2.2 Criterios de Remediación o Restauración del Suelo.

Los criterios de Remediación o Restauración se establecen de acuerdo al uso que del suelo (agrícola, comercial, residencial e industrial), y son presentados en la Tabla 3. Tienen el propósito de establecer los niveles máximos de concentración de contaminantes de un suelo en proceso de remediación o restauración.

## Capítulo 2

### Metodología

#### 2.1. Fase de campo

En la fase de campo se tomó las muestras de suelo.

##### 2.1.1. Georreferenciación del sitio de muestreo.

En el sitio designado se identificaron un total de 12 puntos de muestreo de suelos tomados en la parroquia de Puembo, ubicada al nororiente de la ciudad de Quito, provincia de Pichincha.

**Tabla 8.** Coordenadas del sitio de investigación y sus condiciones climáticas.

Longitud	-0.199207
Latitud	-78.369792
Altitud	2450 m.s.n.m
Temperatura	10-25 °C
Humedad	88 %
Velocidad del viento	4 m/h

**Nota:** Tomado del programa Latitude & Longitude, 2013

##### 2.1.2. Muestreo de suelos.

Se realizó dos muestreos: Un muestreo para análisis físico-químico tomando muestras de suelo en Puembo y analizadas en el laboratorio de agua y suelos de Cayambe. El otro muestreo para análisis microbiológico en muestras de suelo de Puembo y analizadas en los laboratorios de Ciencias de la Vida.

### **2.1.2.1. Muestreo de suelos para análisis físico-químico.**

Se utilizó la técnica tresbolillo en los 12 puntos de muestreo, realizando huecos de 25 cm largo x 25 cm ancho x 35 cm de profundidad, posteriormente se tomaron 12 submuestras de suelo de 1 kg cada una; obteniendo 12 submuestras, fueron mezcladas para obtener una sola muestra de 1 kg, se guardó en una funda hermética, finalmente se transportó en un cooler al laboratorio de agua y suelos de la Universidad Politécnica Salesiana en Cayambe.

### **2.1.2.2. Muestreo de suelos para análisis microbiológico.**

De los 12 puntos de muestreo anteriores se tomaron mediante jeringuillas estériles 60 g de suelo, con el propósito de no alterar la carga microbiana autóctona del suelo, las jeringuillas fueron guardadas en fundas herméticas etiquetando cada muestra, se colocaron en un cooler y se transportó al laboratorio de Ciencias de la Vida UPS sede Quito.

### **2.1.3. Obtención de petróleo.**

El petróleo se obtuvo de la refinería de Esmeraldas, con un volumen de 3.5 L.

## **2.2. Fase de laboratorio.**

Los análisis microbiológicos se realizaron en los laboratorios de Ciencia de la Vida.

### **2.2.1. Diluciones.**

En el laboratorio se mezclaron todas las muestras (jeringuillas) llegando a un total de 720 g, luego se colocaron 10 g de la muestra en un frasco boeco, que contenía 90 mL de agua destilada estéril, esta mezcla fue homogenizada durante 2 minutos para obtener la solución madre, con la ayuda de una micropipeta se tomó 1 mL de la solución madre y fue transferida a un tubo de ensayo que contiene 9 mL de agua destilada agitando en un vortex para obtener la dilución  $10^{-1}$ , de ésta dilución se tomó

1 mL y se transfirió a un tubo que contiene 9 mL de agua destilada estéril para obtener la dilución  $10^{-2}$ , estos pasos fueron repetidos hasta obtener la dilución ( $10^{-5}$ ) (Huerta, 2009).

### **2.2.2. Medios de cultivo utilizados**

Se utilizaron 4 tipos de agar: PDA (Potato Agar Dextrosa) y SDA (Sabouraud Dextrose Agar) que son medios específicos para hongos; mientras que TSA (Trypticase Soy Agar) y Cetrymida Agar para bacterias. Se prepararon en función de las etiquetas de la casa productora Difco.

### **2.2.3. Análisis Microbiológico de microorganismos.**

Se efectuó la siembra de microorganismos por el método de superficie en caja Petri y el aislamiento de microorganismos.

#### **2.2.3.1. Siembra de superficie en caja Petri.**

Se tomaron 100  $\mu$ L de cada una de las diluciones y se dispensó en las cajas Petri en los medios de cultivo seleccionados, con la ayuda de un asa Drigalski fue esparcido sobre la superficie del medio de cultivo, posteriormente para bacterias se incubó en cajas con medio TSA a 37 °C por 72 h, mientras que para hongos en cajas con medio PDA y SDA a 25 °C por 5 días.

#### **2.2.3.2. Aislamiento de microorganismos**

Una vez observado el crecimiento de los microorganismos en las cajas Petri se procedió aislarlos, para hongos se tomó una porción de cada hongo y se sembró en medio PDA y SDA, mientras que para la bacteria se tomó una colonia y se sembró en medio TSA hasta su purificación. Este procedimiento fue realizado 2 veces por semana durante 1 mes.

### 2.2.3.3. *Aislamiento e identificación de Pseudomonas*

El aislamiento y la identificación de *Pseudomonas* durante el tiempo del ensayo contempla la selección y resiembra de bacterias, caracterización macro y microscópica, identificación con pruebas bioquímicas Microgen, conteo de colonias y conservación de *Pseudomonas*.

#### 2.2.3.3.1. *Selección y resiembra de bacterias.*

Una vez purificadas las bacterias en medio TSA, se escogieron las colonias que presentaron características similares a *Pseudomonas* (tamaño, color, mucosidad, forma de colonias, tipo de bordes), mediante un asa microbiológica se resembró cada colonia en medio Cetrymida, específico para *Pseudomonas*, este procedimiento fue realizado por 4 semanas.

#### 2.2.3.3.2. *Caracterización macroscópica*

A partir de 10 cajas con medio Cetrymida se tomó una colonia y mediante el estereomicroscopio y lente 2 X se observó las características macroscópicas de las colonias como: tamaño, color, aspecto, tipos de borde, superficie.

#### 2.2.3.3.3. *Caracterización microscópica*

Se efectuó tinción gram a partir de las cajas seleccionadas de la siguiente manera: se tomó una colonia y se realizó un frotis en un portaobjetos, este frotis fue fijado en un mechero y cubierto con cristal violeta por un minuto, se pasó 3 veces la placa por la llama hasta evaporarlo y fue lavado con agua destilada, se ejecutó el mismo proceso para alcohol-acetona, por último fue cubierto por safranina por 10 segundos, se pasó veces por el mechero y se lavó con agua destilada, al final se dejó secar por unos 5 minutos y se observó al microscopio con lente de 100 X el tipo de bacteria por coloración (gram positiva o negativa), tamaño, color, forma, sistema flagelar (Santambrosio, Ortega, & Garibaldi, 2009).

#### 2.2.3.3.4. *Identificación con pruebas bioquímicas*

Se utilizó un kit Microgen<sup>®</sup>™ GnA+B-ID System, a partir de un cultivo de 24 h se procedió a preparar una dilución  $10^{-1}$  en 5 mL de suero fisiológico estéril, mediante una micropipeta fue transferido 100  $\mu$ L de la suspensión a cada pocillo de las tiras reactivas GN A Y GN B, incubando a 37 °C durante 24 h y 48 h. Se procedió a leer 24 h después de la incubación de cada pocillo registrando los cambios de color como detalla el manual de uso, verificando así la lectura positiva o negativa, se volvió incubar las pruebas a 37 °C durante otras 24 h, transcurridas el tiempo de 48 h de incubación fueron añadidos los reactivos correspondientes en los pocillos de la segunda tira reactiva, se añadió en el pocillo 19 reactivo de kovacs, en el pocillo 20 una gota de nitrato A y una gota de nitrato B, se realizó la lectura después de 60 seg, en el pocillo 23 se colocó una gota de reactivo VPI seguido de una gota de reactivo VP II, leyéndose la prueba después de 15 min.

Se dio la lectura final al transcurrir 48 h de incubación, registrando los resultados en el formulario de informes adjunto en el kit, se procedió a calcular la codificación octal y se interpretó utilizando el software MID (Microgen bioproducts, 2007).

#### 2.2.3.3.5. *Conteo de colonias*

A partir de un tubo falcón con crecimiento bacteriano de 24 h en medio TSB (solución madre) se realizaron diluciones desde  $10^1$  hasta  $10^3$ ; se tomaron 100  $\mu$ L de cada dilución y se dispensaron en cajas con medio TSA (2 cajas por dilución) y con un asa Drigalski se esparció sobre la superficie del medio de cultivo. Tanto las cajas como las diluciones se incubaron a 37 °C. Transcurridas 24 h se efectuó el conteo de colonias que crecieron en el medio TSA. Este proceso se desempeñó por 3 días consecutivos.

El conteo de colonias se procedió multiplicando el número de colonias encontradas en la caja Petri por el factor de dilución, este procedimiento se realizó para reportar el número de colonias por dilución.

#### 2.2.3.3.6. *Conservación de Pseudomonas*

Se tomó con el asa microbiológica varias colonias de una caja Petri y se dispersaron en el medio que contiene el tubo de CRYOBANK, se agitó por 3 minutos con el objetivo que la bacteria se adhieran a las perlas, finalmente se removió el medio de cultivo del tubo con una micropipeta estéril y se congeló a una temperatura de -80 °C.

#### 2.2.3.4. ***Inoculación de Pseudomonas sp en suelo con petróleo.***

La inoculación de *Pseudomonas* durante el tiempo del ensayo contempla los siguientes pasos como: preparación del cultivo bacteriano y de la solución, medición de la concentración por espectroscopia UV-VISIBLE y la aplicación del inóculo a los tratamientos que se describen a continuación.

##### 2.2.3.4.1. *Preparación del cultivo bacteriano*

Se tomó varias veces las colonias de *Pseudomonas* sembradas en cajas Petri, con la ayuda de un asa microbiológica fueron colocadas en 6 tubos plásticos con 50 mL de medio TSB y se incubaron por 24 h a una temperatura de 35 °C.

##### 2.2.3.4.2. *Preparación de la solución.*

Después de las 24 h se procedió a centrifugar los 6 tubos falcón durante 15 minutos a 3500 rpm, se descartó el medio TSB quedando solo el pellet bacteriano en el fondo de los tubos, cada tubo falcón fue suspendido con 45 mL de agua peptonada, a continuación se colocó en un vortex para homogenizar el pellet y finalmente se colocó en un frasco boeco de 1000 mL estéril aforándolo a 800 mL con agua peptonada.

#### 2.2.3.4.3. *Medición de la concentración por espectrofotometría*

##### *UV-VISIBLE.*

Con la solución preparada anteriormente se procedió a medir la concentración en un espectrofotómetro UV visible previamente calibrado, se seleccionó la longitud de onda de 655 nm (nanómetros) mediante la solución blanco (agua de peptona) colocada previamente en una celda de plástico, se situó en el porta celdas dentro del espectrofotómetro con el objetivo de ubicar el contador en 0 para iniciar la medición, se removió el “blanco” del porta celdas y se colocó una celda nueva con 1 mL de la solución preparada de *Pseudomonas* realizando la medición, hasta alcanzar una absorbancia de  $0.200 \pm 0.010$ , para lograr una concentración de  $10^6$  UFC/mL .

#### 2.2.3.4.4. *Aplicación del inóculo de Pseudomonas*

Se aplicó 100 mL de solución de *Pseudomonas* mediante un aspersor a cada una de las cajas con los tratamientos correspondientes, la aplicación se realizó 1 vez por semana por 3 meses a excepción de las cajas testigo.

#### 2.2.3.5. *Aislamiento e identificación de Trichoderma.*

El aislamiento y la identificación de *Trichoderma* conlleva los siguientes pasos: caracterización macro y microscópica, identificación y conservación.

##### 2.2.3.5.1. *Caracterización macroscópica*

A partir de las cajas con hongos purificadas anteriormente, se escogieron las que presentaron mejor crecimiento, coloración verde por el haz y amarillo en el envés, forma de crecimiento de los halos.

#### 2.2.3.5.2. *Caracterización microscópica e identificación de Trichoderma.*

Por la técnica de scotch, se dispuso en un portaobjetos una gota de azul de lactofenol y mediante un fragmento de cinta scotch se colocó sobre el cultivo del hongo, se ubicó la cinta en el portaobjetos y se observó en el microscopio con lentes 4 X, 10 X y 40 X, mediante la guía de H. Barnett, código 46 perteneciente a *Trichoderma*, se procedió a comparar las estructuras vistas en el microscopio con las del autor las cuales cita “Conidióforos hialinos, en posición vertical, muy ramificado en racimos, no verticiladas; fiálides individuales o en grupos; conidias hialinas ovoides ” (págs. 52-53).

#### 2.2.3.5.3. *Cinética de crecimiento.*

Con un calibrador se midió por el reverso de la caja Petri el crecimiento del hongo expresado en mm registrando cada 24 horas durante 4 días, con estos datos se realizó una curva de crecimiento.

#### 2.2.3.5.4. *Conservación de Trichoderma.*

Mediante un asa microbiológica se tomó una porción del hongo *Trichoderma* de una caja Petri y se introdujo en un tubo de CRYOBANK, se agitó con el objetivo que el hongo se adhiriera a las perlas, finalmente se removió el medio de cultivo del tubo con una micropipeta estéril y se congeló a una temperatura de -80 °C.

#### 2.2.3.6. *Inoculación de Trichoderma sp en suelo con petróleo.*

La inoculación conlleva los siguientes pasos: preparación de la solución, conteo de esporas, inoculación y aplicación de la solución de *Trichoderma*.

#### 2.2.3.6.1. Preparación de la solución.

Se preparó una solución de 792 mL de suero fisiológico añadiendo 8 mL de tween 80 al 1 % completando el volumen de 800 mL, se tomó el contenido del hongo de una caja Petri mediante un asa microbiológica y se colocó dentro de la solución, se agitó por 5 minutos hasta que la solución este homogénea.

#### 2.2.3.6.2. Conteo de esporas.

Se colocó un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer, mediante una micropipeta fue extraído 10  $\mu$ L de la solución colocada entre el borde del cubreobjetos y la cámara de Neubauer, con el objetivo de que el líquido penetre por capilaridad entre la cámara y el cubreobjetos. Se colocó la cámara de Neubauer en la bandeja del microscopio y se enfocó el microscopio hasta que pueden verse nítidas las células mirando por el binocular, se enfocó con un lente de 10 X para ubicar el campo central de 1 mm<sup>2</sup>; este cuadro central se encuentra subdividido en 25 cuadrados cada uno de estos con un área de 0.4 mm<sup>2</sup>, se enfocó con el lente de 40 X, fueron contados los cuadrados de los extremos y el cuadrado central, cinco en total, anotando la cantidad de células (Bastidas, 2015) Finalmente se determinaron el número de esporas por mL hasta alcanzar una concentración de 10<sup>6</sup>, se determinó mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{ml}} = \# \text{ de Esporas contadas} \times 25000 \times \text{factor de dilución}$$

**Fórmula 2.** Conteo de esporas por mL

Tomado de (Hidalgo & Osorio, 2013).

**2.2.3.6.3. *Inoculación y aplicación del inóculo de *Trichoderma* en suelo con petróleo.***

Se aplicaron 100 mL de la solución de *Trichoderma* mediante un aspersor a cada caja con los tratamientos correspondientes mezclándolas hasta homogenizar el suelo, este proceso se realizó 1 vez por semana por 3 meses a excepción de las cajas testigo.

**2.2.3.7. *Inoculación y aplicación del consorcio microbiano.***

De las soluciones de *Trichoderma* y *Pseudomonas* se extrajo 100 mL respectivamente combinándolos en un aspersor, aplicando a los tratamientos correspondientes y mezclando hasta obtener un suelo homogenizado, este procedimiento se realizó 1 vez por semana durante 3 meses a excepción de las cajas testigo.

**2.2.3.8. *Aplicación de agua al suelo testigo.***

Mediante un aspersor se colocó 100 mL de agua destilada en las cajas con suelo testigo y se mezcló hasta la homogenización total del suelo, este procedimiento fue realizado 1 vez por semana durante 3 meses.

**2.2.4. Montaje del ensayo.**

Para el montaje del ensayo se siguió los siguientes pasos: preparación de las cajas de ensayo, preparación del suelo, adición de petróleo a las cajas de ensayos, tratamientos del ensayo y disposición de los tratamientos del ensayo.

**2.2.4.1. *Preparación de las cajas de ensayo.***

Se utilizó y cubrió con plástico negro 16 cajas de cartón con dimensiones 28.5 cm de ancho x 10 cm de largo y 22 cm de profundidad etiquetándolas respectivamente.

**2.2.4.2. *Preparación del suelo.***

El suelo fue tamizado con los tamices: 3<sub>1/2</sub>, 10, 14, 18, 20, 16, 25 micrómetros. Se pesó y colocó 2.5 kilos en cada caja.

#### 2.2.4.3. Adición de petróleo las cajas de ensayos.

Con una probeta se tomó 110 mL de petróleo y con otra probeta se tomó 300 mL de agua destilada, ambas probetas fueron vertidas al suelo de todos los tratamientos y se mezcló por 1 minuto hasta su homogenización.

#### 2.2.4.4. Tratamientos del ensayo.

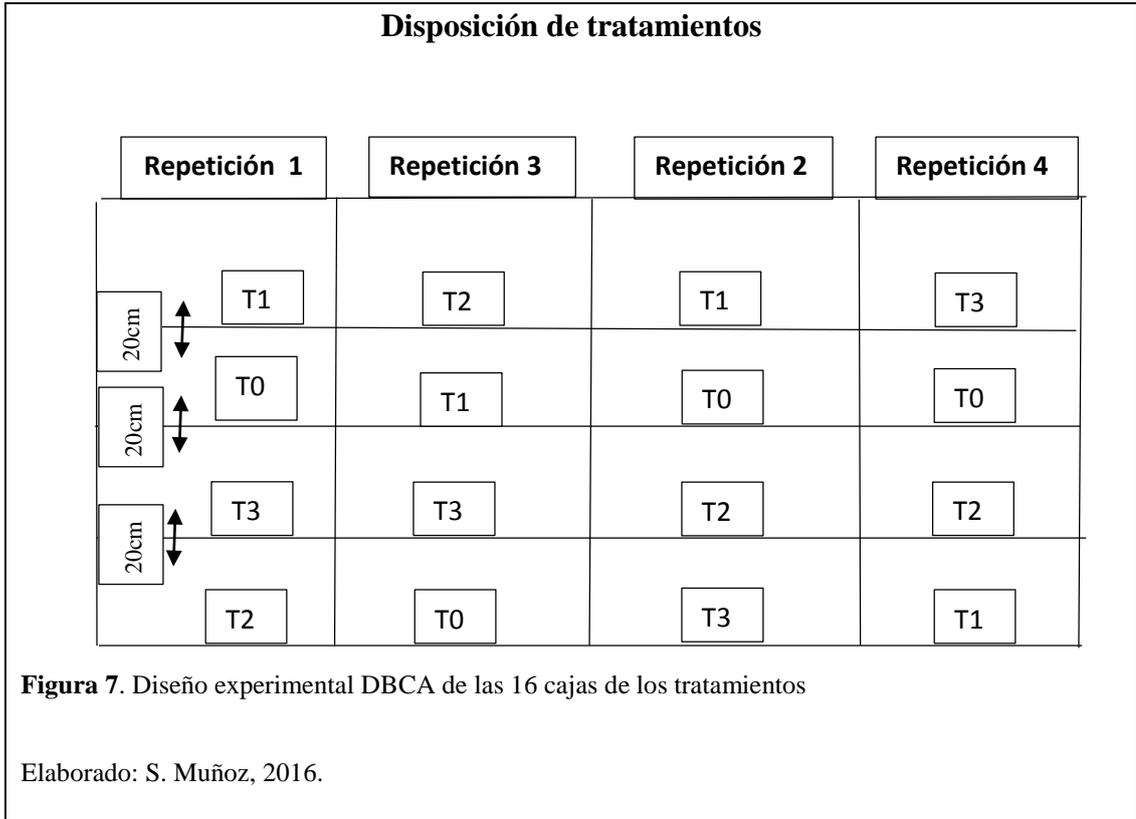
**Tabla 9.** Tratamientos del ensayo.

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	DOSIS
T0	Suelo + hidrocarburo	2.5 kg +110 mL
T1	Suelo + hidrocarburo + <i>Trichoderma</i>	2.5 kg +110 mL+100 mL
T2	Suelo + hidrocarburo + <i>Pseudomonas</i>	2.5 kg+110 mL+100 mL
T3	Suelo+ hidrocarburo + <i>Trichoderma</i> + <i>Pseudomonas</i>	2.5 kg+110 mL+100 mL+100 mL

Nota: Elaborado por S. Muñoz 2016.

#### 2.2.4.5. Disposición de los tratamientos del ensayo.

Se dispuso las 16 cajas en un DBCA (diseño de bloques completos al azar) con cuatro repeticiones que tuvieron condiciones ambientales homogéneas, adicionalmente se añadió luz artificial proveniente de focos fluorescentes con temperatura 20 °C.



### 2.2.5. Análisis físico-químicos.

Se efectuaron en los laboratorios de suelos y agua de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cayambe, fueron realizados análisis al inicio y al final del ensayo. Los parámetros físicos químicos analizados fueron: materia orgánica, P, K, Ca, Mg asimilable, Fe, Mn, Cu, Zn, Sodio intercambiable, B y S extractable, pH, conductividad eléctrica, textura y clase textural, basados en procedimientos estandarizados internacionales (Ver anexo 1).

**Tabla 10.** Parámetros analizados y su metodología.

<b>Parámetro</b>	<b>Método de Valoración</b>	<b>Unidades de Medición</b>
Materia Orgánica	Walkley Back	%
Fósforo Asimilable	Olsen Modificado	ppm
Potasio Asimilable	Olsen Modificado- Fotometría de flama	meq/100 g
Calcio Asimilable	Olsen Modificado -Fotometría de absorción atómica	meq/100 g
Magnesio Asimilable	Olsen Modificado-Fotometría de absorción atómica	meq/100 g
Fe, Mn, Cu, Zn	Olsen Modificado -Fotometría de absorción atómica	mg/L
Sodio intercambiable	Acetato de amonio-Fotometría de absorción atómica	meq/100 g
Boro extractable	Curcumina en ácido acético glacial- Fotocolorimetría	mg/L
Azufre	Turbidimétrico -Fotocolorimetría	ppm

Nota: Elaborado por S. Muñoz 2016.

### **2.2.6. Análisis de hidrocarburo (TPH).**

Se realizaron análisis al inicio, a la mitad y al final del ensayo en el Centro de Soluciones Analíticas Integrales CENTROCESAL.

**Tabla 11.** Parámetros de TPH analizados y su metodología.

DESCRIPCIÓN	PROCEDIMIENTO	UNIDADES DE MEDICIÓN
TPH	Method EPA 8015	mg/kg

Nota: Elaborado por S. Muñoz 2016.

### 2.2.7. Diseño Experimental.

**Tabla 12.** Características del diseño experimental.

Datos	Detalle
Diseño Experimental	DBCA
Unidades experimentales	16 (cajas)
Tratamientos	4
Repeticiones	4

Nota: Elaborado por S. Muñoz 2016.

#### 2.2.7.1. Análisis estadístico.

Para los análisis físicos químicos de los suelos se trabajó con los resultados obtenidos al inicio y al final del ensayo.

Para los TPH se ocupó los resultados de los análisis realizados al inicio y al final del ensayo.

Para variables como: temperatura, pH, conductividad eléctrica y humedad, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de significancia de Tukey al 5%, mediante el programa estadístico "stadistick".

#### 2.2.7.2. Manejo de las variables del ensayo

Las variables evaluadas fueron temperatura, pH, conductividad eléctrica y humedad.

#### 2.2.7.2.1. *Temperatura*

Mediante un termómetro de mercurio se midió la temperatura en °C en 3 puntos diferentes de cada caja durante 3 meses.

#### 2.2.7.2.2. *Humedad*

De cada tratamiento se escogió 2 g de suelo y se las colocó en crisoles previamente tarados, se pesaron el crisol + suelo (PN+C), una vez pesados se las puso en una estufa a 105°C por 3 horas, pasadas las 3 horas se las ubicó en un desecador por 30 minutos, después de 30 minutos se volvió a pesar (PS+C), una vez realizada esto se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ humedad} = \frac{(PN + C) - (PS + C)}{((PS + C) - C)} \times 100$$

**Fórmula 3.** Cálculo del porcentaje de humedad mediante crisoles

Tomado de (Rodríguez & Rodríguez, 2011, págs. 105-106)

#### 2.2.7.2.3. *pH y conductividad eléctrica*

Se utilizó una relación 1:2, 5 g de suelo en 10 mL de agua destilada, se agitó y dejó reposar por 5 minutos, después de este tiempo se volvió agitar y mediante el potenciómetro calibrado se midió el pH y la conductividad eléctrica introduciendo el electrodo correspondiente en la solución, se esperó 10 segundos y se registró los valores de pH y conductividad eléctrica en dS/m durante tres meses.

### Capítulo 3:

#### Resultados y discusión

##### 3.1. Análisis físico químico.

Se analizaron los macro elementos del suelo de los ensayos.

##### 3.1.1. Macro elementos.

**Tabla 13.** Resultados de los macro elementos de los análisis físico – químicos

Valores Según INIAP	N %		P (ppm)		K (meq/100g)		Mg (meq/100g)		Ca (meq/100g)	
	In	Fn	In	Fn	In	Fn	In	Fn	In	Fn
Alto	> 0.40		>60.0		>2		>4.0		>15.0	
Medio	0.30-0.40		20.0-60.0		0.2-2		2.0-4.0		8.0-15.0	
Bajo	< 0.30		<20.0		<0.2		<2.0		<8.0	
T0	0.58	0.51	0.1	4.50	8.95	1.55	4.68	3.32	9.49	16.27
T1	0.58	0.53	0.1	47.68	8.95	1.71	4.68	3.71	9.49	16.41
T2	0.58	0.45	0.1	56.21	8.95	1.64	4.68	3.45	9.49	15.8
T3	0.58	0.48	0.1	43.82	8.95	1.58	4.68	3.51	9.49	15.9

Nota: In: inicio del ensayo, Fn: final del ensayo; T0: Suelo testigo; T1: Suelo+*Trichoderma* sp; T2: Suelo+*Pseudomonas fluorescens*; T3: Suelo+*Trichoderma* sp+ *Pseudomonas fluorescens*. Valores de referencia de suelos adaptados por Estación Experimental Tropical “Pichilingue”. INIAP. 2002. por S. Muñoz, 2016.

Como se observa en la tabla 13 todos los tratamientos inician con cantidades de N con 0.58 %, P con 0.1 %, K con 8.95 meq/100g, Mg con 4.68 meq/100g y Ca con 9.49 meq/100g.

Los valores al final del ensayo muestran que N disminuyo en todos los tratamientos, así T1 con 0.53 %, seguido de T0 con 0.51 %, T3 con 0.48 % y T2 con 0.45 %.

La disminución de este elemento se debe a que el nitrógeno del suelo se pudo volatilizar, además que los microorganismos necesitan N para formar otros compuestos como proteínas, enzimas entre otros, los cuales son vitales para su

desarrollo. Posiblemente la disminución de nitrógeno en los tratamientos se deba a los procesos relacionados a la actividad microbiana, ya que durante el proceso de degradación se libera calor por el metabolismo de los microorganismos, formando una temperatura la cual influye para que el nitrógeno se libere a la atmósfera en forma de amoníaco.

Según (Castillo Rodríguez, y otros, 2005, págs. 173-183) la volatilización del amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) es un proceso que ocurre por mineralización de nitrógeno orgánico, desprendiéndose del suelo en forma de gas a la atmósfera a temperaturas en un rango de 13-30 °C. Además (Cholango, 2009) indica que estos elementos son importantes para el desarrollo y la propagación de *Trichoderma*, puesto que la relación carbono-nitrógeno es esencial para la formación de propágulos de *Trichoderma*, en comparación con *Pseudomonas* que se caracteriza por emplear nitratos para utilizarlos en su proceso metabólico de respiración microbiana como citan (Gómez, y otros, 2008, págs. 77-80).

Para el contenido de fósforo los valores al final del ensayo muestran que todos los tratamientos aumentaron. Así T2 con 56.21 ppm, T1 con 47.68 ppm, T3 con 43.82 ppm y T0 con 4.50 ppm.

Este aumento de P posiblemente se deba a que al ser un elemento inmóvil y no estar en formas asimilables, no es absorbido o utilizado por los microorganismos autóctonos como los inoculados para realizar sus actividades de desarrollo y metabolismo.

Se puede observar que las cantidades de fósforo aprovechable no están disponibles para los microorganismos, posiblemente debido a la escasez de bacterias y hongos específicos para la degradación de fósforo, el fósforo no disponible es transformado a

fosfatos los cuales son asimilados y aprovechados por *Trichoderma* y *Pseudomonas* para su metabolismo.

En el suelo existen ciertas bacterias y hongos específicos capaces de llevar a cabo el proceso de solubilización del fósforo, las bacterias están entre el 1-50 % y los hongos entre el 0.1-0.5 % de las poblaciones microbianas del suelo, entre los principales microorganismos que participan en la producción de fósforo asimilable se encuentran bacterias de los géneros como *Bacillus*, *Rhizobium* y *Enterobacter* y hongos como *Aspergillus* y *Penicillium* (Vargas, 2012, pág. 57).

(Andrade , 2012, págs. 52-53) Y (Arévalo, 2014, pág. 12) indican que *Trichoderma* posee diferentes mecanismos que permiten al fósforo pasar a formas más disponibles, como es la capacidad para liberar ácidos orgánicos, la producción fisiológica de protones y la excreción de fosfatasas ácidas permitiendo la solubilización de fósforo con el uso de ciertas enzimas como hexoquinazas o glucoquinazas transformando a formas más asimilables y disponibles.

(López & Quintero, 2006) y (Fernández, Zalba, Sagardoy, & Gómez, 2005) mencionan que las *Pseudomonas* son bacterias con la facultad de producir sustancias biosurfactantes compuestos que se encargan de solubilizar y facilitan la penetración de los hidrocarburos por la pared celular hidrófila, además de que poseen enzimas que degradan hidrocarburos en la membrana citoplasmática, produce cierto ácidos orgánicos implicados en la solubilización del fosfato (Beltrán, 2014, pág. 106).

Los valores al final del ensayo muestran que K y Mg disminuyeron en todos los tratamientos, para potasio: T1 con 1.71 meq/100g, seguido de T2 con 1.64 meq/100g, T3 con 1.58 meq/100g y T0 con 1.55 meq/100g. Para magnesio: T1 con 3.71

meq/100g, seguido de T3 con 3.51 meq/100g, T2 con 3.45 meq/100g y T0 con 3.32 meq/100g.

Estos elementos se encuentran formando parte de ciertos minerales orgánicos no asimilables para los microorganismos pero al sufrir transformaciones se separan de diversas formas, pero su forma más asimilable son como iones, posiblemente la reducción se debe a que  $K^+$  y  $Mg^{++}$  intervienen como cofactores para poder metabolizar y transformar otros elementos inorgánicos (N, P) a sus formas disponibles.

El potasio inorgánico se encuentra en los suelos conformando varios minerales entre estos silicatos o láminas de arcillas, una vez que el potasio se desprende por reacciones enzimáticas, se convierte en asimilable para los microorganismos, su absorción es rápida en forma  $K^+$ , intercede como activador enzimático para conseguir que ciertas sustancias inorgánicas puedan ser aprovechables por los microorganismos, interviene en aproximadamente cincuenta sistemas enzimáticos como: el metabolismo oxidativo síntesis de proteínas, equilibrio osmótico entre otras funciones, por lo que se requiere en una concentración elevada en el medio (Oliveira, Afif, & Mayor, 2006, págs. 43-46). Como mencionan (Infante, Morales, & Ehrmann, 2010) Y (Dibble & Bartha, 1979) “en suelos que exista una contaminación producida por petróleo, la existencia o la adición de potasio puede mejorar la tasa de biodegradación.”

(Castillo Rodríguez, y otros, 2005, págs. 210-220) Mencionan que el ion  $Mg^{++}$  interviene como un importante catión celular, cofactor inorgánico en muchas reacciones enzimáticas, incluyendo aquellas que requieren ATP; funciona uniendo las enzimas a los substratos se encarga de la estabilizar ribosomas, membranas y ácidos nucleicos como cofactor de diversas reacciones.

Los valores al final del ensayo muestran que Ca aumento en todos los tratamientos T0 con 16.47 meq/100g, seguido de T1 con 16.21 meq/100g, T3 con 15.8 meq/100g y T2 con 15.8 meq/100g.

El incremento de calcio en el suelo de los tratamientos posiblemente se debe a la adición de petróleo al suelo o a las reacciones biológicas realizadas por los microorganismos como fijación de nitrógeno o transformación de fósforo no asimilable a disponible, liberando partículas de calcio al medio.

(Castillo Rodríguez, y otros, 2005, pág. 215) Indican que en suelos donde se encuentre en gran cantidad el ion  $\text{Ca}^+$ , el dióxido de carbono derivada de oxidaciones microbianas tiene como resultado la precipitación de este compuesto en forma de  $\text{CaCO}_3$ , además cita que “procesos como la amonificación o las reducciones de nitrato a sulfato favorecen a la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  al suelo”. El ion  $\text{Ca}^{++}$  es un cofactor de enzimas que interviene en la formación de otras moléculas como proteinasas.

(Bravo, 2007, págs. 7-8) indica que para realizar algunos de los procesos de extracción de crudo como es la perforación se utilizan lodos de perforación, los cuales contienen como uno de sus componentes principales el carbonato de calcio y el cloruro de calcio como emulsificante para incrementar la viscosidad de los lodos y lignosulfato de calcio en el proceso de cementación.

### 3.1.2. Medición de variables.

#### 3.1.2.1. Potencial de hidrógeno (pH)

**Tabla 14.** Análisis de varianza para pH, Tukey al 5%

Análisis de Varianza (ANOVA)						Tukey (5 %)		
CV= 3.6 %								
Datos	SC	GL	CM	F	p-valor	Tratamientos	Media	Rango
Error	5.7	233	0.06			T0	7.0	A
Repeticiones	35.07	3	0.02	0.36	0.7799	T1	7.0	A
Tratamientos	0.1	3	0.03	0.53	0.6641	T2	6.9	A
Total	40.15	239				T3	7.0	A

Nota: GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P-valor: probabilidad; CV: coeficiente de variación; T0: Suelo testigo; T1: Suelo+*Trichoderma*; T2: Suelo+*Pseudomonas fluorescens*; T3: Suelo+*Trichoderma*+ *Pseudomonas fluorescens*. Elaborado por S. Muñoz 2016.

Como se muestra en la tabla 14, para la variable pH los tratamientos mostraron valores similares . Así T0, T1 y T3 con 7.0 y T2 con 6.9. Los tratamientos se encuentran en el rango de significancia A, es decir que estadísticamente son iguales. El CV es 3.6 %, indica que se encuentra dentro de los rangos permitidos para este tipo de ensayos y corrobora que los datos obtenidos durante la investigación son confiables.

Al comparar el suelo del ensayo sin hidrocarburos obtuvo un pH de 7.8 con el suelo de los tratamientos se pudo observar que el pH disminuyó, posiblemente debido a la adición del hidrocarburo en el suelo, alterando la composición del medio y haciendo que disminuya el pH de los tratamientos del ensayo que fluctuaron entre 6.9 y 7.0.

La reducción del pH en los tratamientos también pudo darse por la liberación de compuestos del hidrocarburo (alcanos de cadena larga y ácidos grasos) mediante la degradabilidad del hidrocarburo por parte de los microorganismos del suelo utilizados en el ensayo y la posible carga microbiana propia tanto del hidrocarburo como del suelo en estudio.

Los pH a los cuales trabajan los dos microorganismos se encuentran dentro de los pH requeridos para su metabolismo. *Trichoderma* sp se desarrolla en un rango de 5-7 y *Pseudomonas fluorescens* a un rango de 7-8, demostrando que el pH de los tratamientos del ensayo se encuentra dentro de los rangos y contribuyó a la degradación de los hidrocarburos.

Como cita (Britton, 1984, págs. 89-129) la acidificación del pH en los suelos contaminados con hidrocarburos fue causado por el proceso de degradación, debido a la emancipación de ácidos grasos y compuestos de cadena larga durante el proceso de biodegradación.

(Martínez & Gaju, 2005, pág. 82) y (Pardo, Perdomo, & Benavides, 2004, pág. 42) mencionan que los pH óptimos para la degradación de hidrocarburos se encuentra en rangos de 7.0 a 8.0. El pH del ensayo se encuentra dentro de los rangos que menciona la literatura, lo que corrobora los datos del ensayo.

Como indican (Castro & Rivillas, 2012, pág. 6) *Trichoderma* se desarrolla en un rango de pH de 5.5–7.5 y para *Pseudomonas fluorescens* tienen un rango de pH de 6-8 según (Gómez, y otros, 2008, pág. 40).

### 3.1.2.2. Conductividad eléctrica (C.E).

**Tabla 15.** Análisis de varianza para C.E, Tukey al 5%.

Análisis de Varianza (ANOVA)								
CV= 2.0 %						Tukey (5 %)		
Datos	SC	GL	CM	F	p-valor	Tratamientos	Media (dS/m)	Rango
Error	45.01	233	0.53			T0	1.9	A
Repeticiones	0.01	3	0.51	1.22	0.3572	T1	1.8	A
Tratamientos	32.02	3	0.54	4.02	0.0453	T2	1.9	A
Total	77.04	239				T3	1.8	A

Nota: GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P-valor: probabilidad; CV: coeficiente de variación; T0: Suelo testigo; T1: Suelo+*Trichoderma*; T2: Suelo+*Pseudomonas fluorescens*; T3: Suelo+*Trichoderma*+ *Pseudomonas fluorescens*. Elaborado por S. Muñoz 2016.

Como se muestra en la tabla 15, para la variable C.E, todos los tratamientos mostraron valores similares que oscilaron entre 1.8 y 1.9 dS/m. Así T0 y T2 con 1.9 dS/m, T1 y T3 con 1.8 dS/m. Los tratamientos se hallan en el rango de significancia A, es decir que estadísticamente son iguales. El CV es 2.0 %, indica que se encuentra dentro de los rangos permitidos para este tipo de ensayos y corrobora que los datos obtenidos durante la investigación son confiables.

Al comparar la C.E de un suelo sin hidrocarburo con valor de 3.84 dS/m con el suelo con el hidrocarburo se observó que aumento a 6.35 dS/m fuera de los rangos establecidos por la literatura, pero transcurrido el ensayo de biorremediación se observó que los valores de los tratamientos del ensayo fluctuaron entre 1.8–1.9 dS/m, posiblemente el hidrocarburo contenía compuestos salinos empleados en los procesos de obtención y purificación del hidrocarburo, provocando que la conductividad

aumente, sin embargo después del ensayo de biorremediación se evidencio que la C.E disminuyo, atribuyendo a que los microorganismos transformaron las sales para luego utilizarlas para su metabolismo, además de la formación de ciertas moléculas y sustancias orgánicas.

Según (Garza, Ortiz, Macias, & Coll, 2008, págs. 48-49) y (Martínez & López, 2001, pág. 14), mencionan que la presencia de hidrocarburos en el suelo aumentaron la C.E y al mismo tiempo estimularon el metabolismo de las poblaciones microbianas, provocando que los hidrocarburos no imposibiliten la solubilización de las sales y iones existentes en el suelo. Así mismo (Osuji & Opiah, 2007) indican que la C.E disminuye debido a un acrecimiento en la actividad microbiológica, además del uso de aceptores de electrones (azufre o nitrato) los cuales son indispensables para el metabolismo de los microorganismos. Según el (Tulas, Libro VI, anexo 2, 2012, págs. 363-364) los criterios de restauración de suelos contaminados abarcan una conductividad eléctrica valores no mayores a 4 dS/m, por lo cual el ensayo se encuentra dentro de los parámetros del ensayo.

### 3.1.2.3. *Temperatura.*

**Tabla 16.** Análisis de varianza para temperatura, Tukey al 5%.

Análisis de Varianza (ANOVA)						Tukey (5%)		
CV= 4.0%								
Datos	SC	GL	CM	F	p-valor	Tratamientos	Media °C	Rango
Error	643.39	1097	0.59			T0	18.8	A
Repeticiones	71.21	3	23.74	40.47	<0.0001	T1	18.7	A
Tratamientos	0.58	3	0.19	0.33	0.8026	T2	18.6	A
Total	715.18	1103				T3	18.7	A

Nota: GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P-valor: probabilidad; CV: coeficiente de variación; T0: Suelo testigo; T1: Suelo+*Trichoderma*; T2: Suelo+*Pseudomonas fluorescens*; T3: Suelo+*Trichoderma*+ *Pseudomonas fluorescens*. Elaborado por S. Muñoz 2016.

La tabla 16 indica que para la variable temperatura, los tratamientos mostraron valores similares que oscilan entre 18.6 y 18.8 °C. Así T1 con 18.7 °C, T2 con 18.6 °C, T3 con 18.7 °C y T0 con 18.8 °C. Los tratamientos se encuentran en el rango de significancia A, es decir que estadísticamente son iguales. El CV es 4.0 %, indica que se encuentra dentro de los rangos permitidos para este tipo de ensayos y corrobora que los datos obtenidos durante la investigación son confiables.

Las temperaturas expuestas en los tratamientos indican estar cercanas a los rangos de temperatura mesófila (20-45 °C) en las cuales *Trichoderma* sp y *Pseudomonas fluorescens* se desarrollan adecuadamente. La temperatura promedio del ensayo está en 18.7 °C indicando que a pesar de no estar dentro del rango de temperatura mesófila, la degradación del hidrocarburo se realizó de manera más lenta, además la carga microbiana adicionada favoreció a preservar la temperaturas en los tratamientos.

Según (Wick, Haus, Sukkariyah, Haering, & Daniels, 2011, pág. 24) mencionan que a temperaturas inferiores a las óptimas, la degradación se ve perjudicada, disminuyendo la velocidad de reacción, modificando su solubilidad y reduciendo la volatilización de partes tóxicas que alterarían la actividad microbiana. Como citan (Castillo Rodríguez, y otros, 2005) una temperatura mesófila óptima se encuentra en un rango de 20-45 °C.

### 3.1.2.4. Humedad.

**Tabla 17.** Análisis de varianza para humedad, Tukey al 5%.

Análisis de Varianza (ANOVA)						Tukey (5%)		
CV= 8.8 %								
Datos	SC	GL	CM	F	P-valor	Tratamientos	Media %	Rango
Error	42.42	101	4.71			T0	23.5	A
Repeticiones	17.22	3	5.74	1.22	0.3583	T1	24.0	A
Tratamientos	18.1	3	6.03	1.28	0.339	T2	25.6	A
Total	77.75	107				T3	26.0	A

Nota: GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P-valor: probabilidad; CV: coeficiente de variación; T0: Suelo testigo; T1: Suelo+*Trichoderma*; T2: Suelo+*Pseudomonas fluorescens*; T3: Suelo+*Trichoderma*+ *Pseudomonas fluorescens*. Elaborado por S. Muñoz 2016.

Como se observa en la tabla 17, para la variable humedad, los tratamientos mostraron valores similares que oscilan entre 23.5 y 26% de humedad. Así T1 con 24.0 %, T2 con 25.6 %, T3 con 26.0 % , T0 con 23.5 %. Los tratamientos se encuentran en el rango de significancia A, es decir que estadísticamente son iguales. El CV fue de 8.8 % mostrando que se encuentra dentro de los rangos permitidos para este tipo de ensayos y muestra confiabilidad de los datos obtenidos. Los porcentajes presentados de humedad corresponden a la fórmula de determinación de humedad en el laboratorio.

Los valores de humedad obtenidos en el ensayo (23.5-26 %), corresponden a cálculos de humedad por el método a la estufa y no están dentro de los rangos de humedad para el proceso de biorremediación.

Las cajas del ensayo sin someter las muestras a la estufa se encontraron en un rango de humedad que fluctuaron entre 55-80 % a capacidad de campo, demostrando estar

en rangos favorables para la biorremediación del hidrocarburo que es entre 30-90 % de humedad.

(Pardo, Perdomo, & Benavides , 2004, pág. 42) Mencionan que un factor limitante para el proceso de biorremediación en suelos es la humedad siendo los límites óptimos de 30-90 %, sin embargo indica que este proceso se vuelve lento en humedades inferiores a este rango.

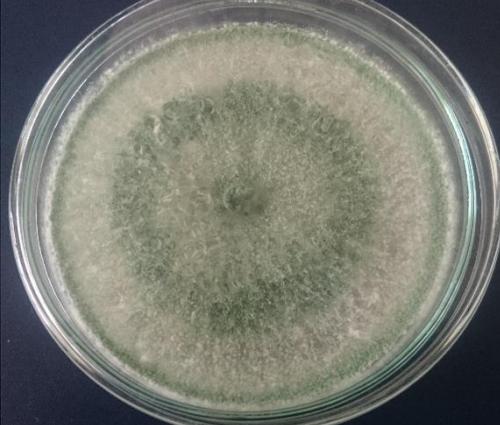
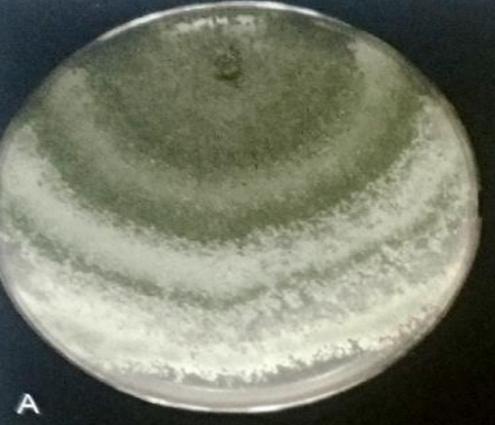
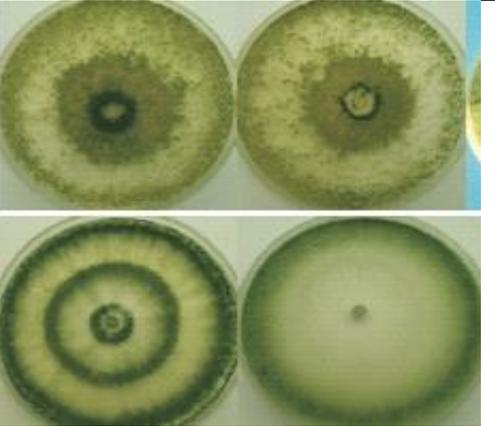
La textura del suelo original (franco arenoso) ayudo a la degradación del hidrocarburo por parte de los microorganismos ya que la mayoría de suelos donde data la contaminación son suelos de textura arcillosa la cual dificulta la degradación del hidrocarburo.

(Carrasco & Ortiz, 1994) Mencionan que los suelos arenosos se caracterizan por poseer una buena porosidad y drenaje, saturándose con poca agua, haciendo que la evaporación sea más rápida y no posea una buena capacidad de retención de humedad.

### 3.1.3. Caracterización macro y microscópica de *Trichoderma*.

#### 3.1.3.1. Caracterización macroscópica

**Tabla 18.** Caracterización macroscópica de *Trichoderma*

Caracterización macroscópica del laboratorio	Caracterización por fuentes bibliográficas
	 <p>(Crous, Verkley, Groenewald, &amp; Samson, 2009)</p>
 <p><b>Figura 8.</b> Fotografías macroscópicas del hongo en medio PDA a 25 °C.</p> <p>Nota: Elaborado por S. Muñoz, 2016.</p>	 <p>(Guidón, y otros, 2010)</p> <p><b>Figura 9.</b> Fotografías macroscópicas de <i>Trichoderma</i> por fuentes bibliográficas</p> <p>Nota: Tomado de (Crous, Verkley, Groenewald, &amp; Samson, 2009) (Guidón, y otros, 2010).</p>

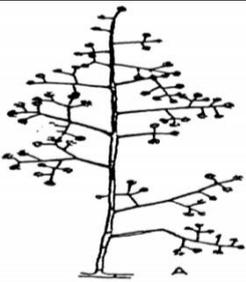
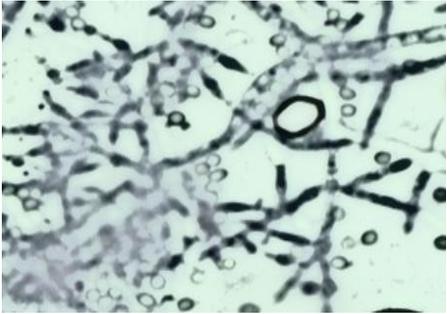
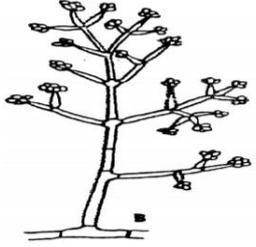
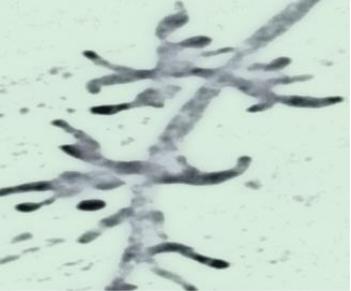
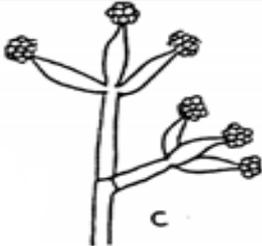
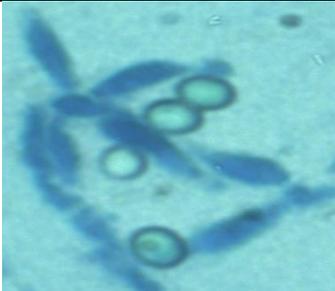
Nota: Elaborado por S. Muñoz 2016.

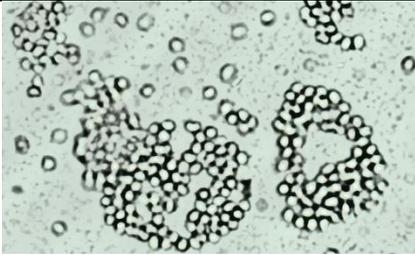
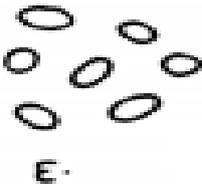
Como se observa en la tabla 18 las figuras de la columna de la izquierda obtenidas en el laboratorio, muestran que los primeros días de crecimiento la coloración del hongo fue blanca tornándose de color verde a partir del 4 día, alcanzando el límite de la caja Petri con un diámetro de 8.5 cm, mientras que a los 7-8 días la coloración del hongo fue totalmente verde, crecimiento de halos concéntricos en formas de anillos con alta esporulación y presencia de abundantes pústulas de color verde o blanco en el centro de la placa, que comparados con las figuras de la columna de la derecha sus características morfológicas son similares, como menciona (Claro, 2006, pág. 10) “Micelio blanco a ligeramente gris, conidiación que cubre toda la superficie de la placa, producción de pústulas concéntricas polvorientas o granulares y de varios tonos verdes, con frecuencia rodeado por micelio blanco estéril”.

(Crous, Verkley, Groenewald, & Samson, 2009) mencionan características como: rápido crecimiento de las colonias, llegando al límite de la caja Petri a los 5-6 días con una temperatura de (20-28 °C), esporulación abundante de pústulas de color verde oscuro; comprobando que las imágenes macroscópicas tomadas en el laboratorio coinciden con las características de *Trichoderma* citadas por dichos autores.

3.1.3.2. Caracterización microscópica

Tabla 19. Caracterización microscópica de *Trichoderma*.

Identificación por la técnica de Scotch ( laboratorio )	Identificación por bibliografía
	 <p data-bbox="1043 837 1219 869"><i>Trichoderma</i></p>
	 <p data-bbox="877 1196 1385 1227">Conidióforos con extensa ramificación</p>
	 <p data-bbox="893 1554 1362 1585">Fialides con producción de conidios</p>
	 <p data-bbox="893 1899 1362 1930">Fialides con producción de conidios</p>

 <p><b>Figura 10.</b> Fotografías tomadas en el laboratorio con lente 40 X</p> <p>Elaborado: S. Muñoz, 2016.</p>	 <p><b>Figura 11.</b> Imágenes microscópicas de <i>Trichoderma</i> obtenidas de Illustrated geran of imperfect fungi</p> <p>Nota: Tomado de (Barnett, 1967)</p>
---	--

Nota: Elaborado por S. Muñoz 2016.

Como se observa en la tabla 19, las figuras de la columna de la izquierda obtenidas en el laboratorio con lente de 40 X presentan características como: hifas delgadas septadas, fialides largas con la producción de conidios en forma ovoide en los segmentos terminales de color verde, estas estructuras comparadas con la columna de la derecha correspondientes a la guía de (Barnett, 1967) que menciona “*Trichoderma* sp presenta hifas septadas, conidióforos hialinos, muy ramificado en racimos, no verticiladas; fiálides individuales o en grupos; conidias ovoides de color verde palido ” (págs. 52-53), se puede corroborar que las imágenes mencionadas por el autor coinciden con las fotografías tomadas en el laboratorio comprobando que dichas estructuras pertenecen al género *Trichoderma*.

### 3.1.4. Identificación de *Pseudomonas* por prueba Microgen<sup>®</sup>

Como se muestra en la tabla 20 la prueba Microgen<sup>®</sup>™ dio positivo para: Oxidasa, motilidad, glucosa, indol, citrato, inositol; y reveló negativo para nitrato, lisina, ornitina, H<sub>2</sub>S, manitol, xilosa, ONPG, ureasa, V.P, TDA, gelatina, malonato, sorbitol, ramnosa, sucrosa, lactosa, arabinosa, adonitol, rafinosa, salicílico y arginina. Así el código octal reflejo 604221000 correspondiente a la bacteria *Pseudomonas*

*fluorescens* con una probabilidad del 89% y se encuentra dentro de los rangos de aceptación que van de 85 a 100% según la prueba de Microgen, ratificándose la identificación de *Pseudomonas fluorescens*.

**Tabla 20.** Identificación de *Pseudomonas fluorescens* mediante Microgen<sup>TM</sup>

				GN A wells												GN B wells																	
Well number				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24						
Reaction				oxidase	motility	nitrate	lysine	ornithine	H <sub>2</sub> S	glucose	mannitol	xylose	ONPG	indole	urease	V.P	citrate	TDA	gelatine	malonate	inositol	sorbitol	rhamnose	sucrose	lactose	arabinose	adonitol	raffinose	salicic	arginine			
Result				+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Reaction index				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of positive reactions				6			0			4			2			2			1			0			0			0					

Nota: Elaborado por S. Muñoz 2016.

### 3.1.5. Medición de Hidrocarburos totales policíclicos (TPH).

**Tabla 21.** Análisis de TPH de los tratamientos.

Tratamientos	Inicio 1 día mg/kg	Final 90 días mg/kg	Porcentaje de degradación %	Valores de referencia Suelos de uso industrial
T0	42070.3	24152.4	42.6	TPH (mg/kg)  <4000
T1		714.1	98.3	
T2		396.1	99.0	
T3		379.2	99.1	

Nota: Nota: T0: Suelo testigo; T1: Suelo+*Trichoderma* sp; T2: Suelo+*Pseudomonas fluorescens*; T3:

Suelo+*Trichoderma* sp+ *Pseudomonas fluorescens*. Elaborado por S. Muñoz, 2016.

Como se observa en la tabla 17, los tratamientos iniciaron con 42070.3 mg/kg de TPH. Al final del ensayo T3 alcanzó el valor más alto de degradación de TPH con 379.2 mg/kg, seguido de T2 con 396.1 mg/kg y por último el T1 con 714.1 mg/kg en comparación con el T0 que obtuvo 24152.4 mg/kg.

Se observa que T2 y T3 presentan valores similares con 99 % y 99.1% respectivamente, posiblemente se deba a que *Pseudomonas* tiene un mayor poder de reproducción y su cinética contribuye a que se reproduzcan en menor tiempo y que las esporas sean viables en comparación con *Trichoderma* que necesita más tiempo para su reproducción. Además *Trichoderma* sp y *Pseudomonas fluorescens* se desarrollan independientemente, su metabolismo, mecanismos de acción, tasas de reproducción y adaptabilidad son distintos. El T0 también degradó en menor porcentaje el hidrocarburo con 42.6%, lo que demuestra que la carga microbiana propia del suelo (bacterias, hongos, levaduras) contribuyó a la degradación del hidrocarburo y que la adición de microorganismos como los utilizados en el ensayo aceleran la degradación. Las condiciones, de pH, temperatura, CE y humedad manejadas en el laboratorio contribuyeron para que el proceso sea estable

*Trichoderma* es un hongo aeróbico con la habilidad de adaptarse y colonizar de manera eficaz distintos ambientes, debido a su elevada capacidad de reproducción, utiliza compuestos orgánicos incluidos el petróleo por su alto contenido de carbono para su crecimiento, gozan de una alta capacidad de esporulación lo que le permite reproducirse de manera rápida en suelos contaminados por compuestos derivados del petróleo (Castro & Rivillas, 2012, págs. 5-6). Algunos estudios demostraron que varios géneros de *Trichoderma* tienen la habilidad de degradar compuestos como hidrocarburos saturados (dodecano, hexadecano) y aromáticos (ácido benzoico, tolueno, bifenilo, fenol, naftaleno entre otras moléculas), demostrando ser eficaces para biorremediación. Existe una degradación notable de hidrocarburos capaces de mineralizar hidrocarburos de más de 4 anillos (Argumendo, Alarcón, Ferrera, & Peña, 2009, págs. 259-264) (Lladó, 2012, págs. 34-35).

El género *Pseudomonas* posee actividades de peroxidasas y oxigenasas, capaces de ocupar compuestos muy tóxicos como compuestos aromáticos, derivados halogenados y otros compuestos orgánicos recalcitrantes, algunos procedentes del petróleo, interceden en el ciclo del C en la naturaleza, lo que los convierten en organismos competentes para la degradación de compuestos de alto y bajo peso molecular, en el caso del petróleo, estas bacterias son fabricantes de biosurfactantes extracelulares como rhamnolipidos, putisolvin y viscosin, compuestos de alto peso molecular constituidos por polímeros de lípidos, que solubilizan y proporcionan la penetración de los hidrocarburos a través de la pared celular y en su membrana citoplasmática contiene ciertas enzimas degradadoras de hidrocarburo (Benavides López de Mesa, y otros, 2006, págs. 86,87) (Bustamante, Suarez, Murillo, & Zuluaga José, 2014, pág. 1) (García & Guerrero, 2004, págs. 27-31) (Di Martino, 2015, págs. 39-40). Según (Raiger & López, 2009, págs. 155-158) se ha encontrado el potencial biodegradador

de ciertas especies de *Pseudomonas*, la cual tiene la capacidad de degradar compuestos derivados del petróleo, como son n-alcenos, naftalenos y tolueno.

Según el RAHOE (2010) señala que los límites permisibles para sitios de uso industrial “donde la actividad principal abarca la elaboración, transformación o construcción de productos varios” (Tulas, Libro VI, anexo 2, 2012, pág. 349) son < 4000 mg/kg de TPH; los resultados obtenidos por T1, T2 y T3 al final del ensayo mostraron que el proceso de biorremediación se encuentran dentro de los límites establecidos, excepto el T0 que esta sobre el limite permisible, señalando que la biorremediación es una técnica que contribuye a la degradación de los hidrocarburos.

## Conclusiones

- En el ensayo se aceptó la hipótesis alternativa ( $H_A$ ) que expone que la aplicación de *Trichoderma* sp y *Pseudomonas* sp favorece la degradación de hidrocarburos presentes en el suelo, así al adicionar estos microorganismos al suelo disminuyó la cantidad de TPH, demostrando su capacidad de biorremediación siendo una herramienta amigable con el ambiente y de tecnología más limpia debido a los mecanismos de acción que generan cada uno de estos.
- Los análisis físicos químicos mostraron que los microorganismos tomaron los elementos del suelo para realizar sus funciones metabólicas, además hicieron que varios elementos pasen a sus formas asimilables para ser absorbidas por las plantas cuando el suelo contaminado se encuentre recuperado.
- La cantidad de TPH inicial en todos los tratamientos fue de 42070.3 mg/kg y al final del ensayo el T1 presento 714.1 mg/kg, el T2 con 396.1 mg/kg, el T3 con 379.2 mg/kg y el T0 con 24152.4 mg/kg, la degradación de los tratamientos T1, T2 y T3 fue del 91 %, estos valores se encuentran dentro de los parámetros para suelos de uso industrial, cumpliendo los límites permisibles según el RAHOE < 4000 mg/kg, demostrando la eficiencia de la tecnología de bioaumentación durante el ensayo de biorremediación.
- El T3 (*Trichoderma* sp + *Pseudomonas fluorescens*) presentó al final 379.2 mg/kg de TPH determinándose que fue el más efectivo en el ensayo, debido a que ambos poseen los mecanismos necesarios para degradar las moléculas de hidrocarburos como enzimas, metabolitos, ácidos orgánicos entre otros, además de presentar condiciones ambientales que favorecieron al proceso de degradación; demostrando que los consorcios microbianos son efectivos cuando existe una compatibilidad entre microorganismos para degradar el hidrocarburo.

## **Recomendaciones**

- Probar diferentes dosis de hidrocarburos y concentraciones de inóculos de microorganismos a partir de la dosis del ensayo (110 mL de hidrocarburo + 100mL de agua destilada + 100 mL de inóculo de microorganismos + 2.5 Kg de suelo) para verificar cual es la dosis más efectiva para biorremediación de hidrocarburos.
- Realizar un análisis microbiológico del suelo para conocer los diferentes microorganismos autóctonos que intervienen y ayudan a la degradación de los hidrocarburos.

## Referencias

- Abad, G. (2008). Tratamiento de fondos de tanques de petróleo usando el método de biorremediación, 7-9. Loja, Ecuador.
- Acuña , A., Aguilera, R., & Aguayo, M. (julio de 2003). Conceptos básicos sobre medio ambiente y desarrollo sustentable. Argentina: Overprint.
- Agency for toxic substances and disease registry. (Agosto de 1999). Total Petroleum Hydrocarbons (TPH), 1-2. Obtenido de <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tfacts123.pdf>
- Agudelo, E. A. (2010). Un método de gestión ambiental adecuado para el tratamiento y la disposición final de un residuo peligroso caso: tierra fuller contaminada con aceite , 61. Medellín, Colombia. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/1917/1/71699844.20101.pdf>
- Alegria, J. (5 de junio de 2013). Biotecnología y biorremediación. Obtenido de <http://www.redicces.org.sv/jspui/bitstream/10972/2429/1/biotecnologia%20y%20bioremediacion.pdf>
- Andrade , C. (2012). Evaluación del efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* para el control de marchitez en mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*) en el cantón Píllaro, provincia de Tungurahua (Tesis). Chimborazo, Ecuador.
- Arévalo, A. (2014). Evaluación y selección de bacterias promotoras de crecimiento vegetal y su capacidad de antagonismo frente a *Rhizotocnia solani* (Tesis). Loja, Ecuador.
- ArgenBio . (2007). Obtenido de La biorremediación: <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades&note=202>
- Argumendo, R., Alarcón, A., Ferrera, R., & Peña, J. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. Revista Int. contaminación ambiental, 258-264.
- Autino, J. C., Romanelli, G., & Ruíz, D. M. (2013). Introducción a la química orgánica. La PLata: Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata.
- Aycachi, R. (04 de Abril de 2008). Biodegradación de diesel, 15-16. Lambayeque, Perú.
- Barnett, H. L. (1967). Illustrated genera of imperfect fungi. Library of congress catalog NO, 60-12998.
- Bastidas, O. (2015). Celeromics. Conteo celular con hematocitómetro: uso elemental del hematocitómetro. Obtenido de <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>
- Beltrán, M. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. Corpoinca ciencia y tecnologías agropecuarias, 106.



- Crous, P., Verkley, G., Groenewald, J., & Samson, R. (2009). Fungal biodiversity. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Déley, Á. (2010). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo del campamento Sacha 161 utilizando el hongo *Pleurotus ostreatus*, 19-20. Riobamba, Ecuador.
- Di Martino, C. (2015). Estudio de bacterias del género *Pseudomonas* en la degradación de hidrocarburos y síntesis de biosurfactantes: análisis del efecto de los polihidroxialcanoatos, 20-50. Buenos Aires, Argentina. Obtenido de [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_5752\\_DiMartino.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_5752_DiMartino.pdf)
- Dibble, J., & Bartha, R. (1979). NCBI. Obtenido de Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC243289/?page=1>
- Espinoza, P. (Mayo de 2009). Evaluación de un sistema de bioestimulación que permita el manejo y uso de rípios de perforación en base agua de pozos petroleros, 38-48. Sangolquí, Ecuador. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/912/1/T-ESPE-023925.pdf>
- FAO. (2013). Obtenido de El suelo: <http://www.fao.org/docrep/006/w1309s/w1309s04.htm>
- Fernández, L., Zalba, P., Sagardoy, M., & Gómez, A. (2005). Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera.
- Gamazo, C., Sánchez, S., & Camacho, A. I. (2013). Microbiología basada en la experimentación.
- García, E., & Guerrero, I. (2004). *Pseudomonas* en biotecnología. BioTecnología, 9(1), 26-31. Obtenido de [http://www.smbb.com.mx/revista/Revista\\_2004\\_1/Pseudomonas.pdf](http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2004_1/Pseudomonas.pdf)
- Gary, J., & Handwerk, G. (1980). Refino de petróleo. New York: Reverté S.A.
- Garza, F., Ortiz, Y., Macias, B., & Coll, D. (2008). Actividad biótica del suelo y la contaminación por hidrocarburos.
- Gavilánez, T. (2013). Determinación de la biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para uso potencial en biorremediación , 8,14. Ambato, Ecuador.
- Gómez, A., Huamán, L., Lauro, C., Quiróz, C., Quineche, D., & Serra, C. (2000). Los hidrocarburos, 2. Lima: Ministerio De Educación DINFOCAD/UCAD/PLANCAD.
- Gómez, S., Gutiérrez, D., Hernández , A., Hernández Cindy, Losada, M., & Mantilla, P. (15 de mayo de 2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. Nova, 6(9), 77-82. Obtenido de <http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/108/214>
- Guidón, C., Guerrero, V., Vargas, F., Carvajal, E., Dolores, G., Bravo, L., . . . Lorito, M. (2010). Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su

- tasa de crecimiento in vitro y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *SciELO*, 28(2).
- Gupta, V. K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R. S., Druzhinina, I., & Tuohy, M. G. (2014). *Biotechnology and biology of Trichoderma*. USA: Elsevier-BookAid.
- Hidalgo, C., & Osorio, E. (junio de 2013). Evaluación y determinación de la capacidad secuestrante de los metales pesados Cromo y Cadmio por taxas de mohos aisladas de los alrededores de los ríos Cutuchi y Machángara, 66-69. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Huerta, L. (2009). Universidad politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de Alimentos. Diluciones. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12656/14.%20Art%C3%ADculo%20docente.%20Diluciones.pdf?sequence=1>
- Infante, C., Morales, F., & Ehrmann, U. (2010). Efecto del potasio en la biorremediación de un suelo contaminado con un crudo liviano. *Bioagro*, 149.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. La Habana, Cuba.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización, NTE INEN 2 319:2001. (2001). Productos derivados del petróleo determinación de la densidad API. Quito. Obtenido de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2319.2001.pdf>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización, NTE INEN 2 341:2003. (2003). Derivados del petróleo. productos relacionados con el petróleo y afines. definiciones. Quito. Obtenido de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2341.2003.pdf>
- Kraus, R. S. (2012). Petróleo: prospección y perforación, 4. Obtenido de <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo3/75.pdf>
- Lladó, S. (Septiembre de 2012). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas, 34-35.
- López, J., & Quintero, G. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA-Publicación científica*, 6.
- Maposita, M. S., Calle, W. O., Fiallos, C. M., & Burgos, F. (14 de Octubre de 2014). Caracterización microbiológica en suelos contaminados por hidrocarburos de tipo *Pseudomonas* en el sector río Bonanza, Provincia de Pastaza, 1-4. Guayaquil, Guayas, Ecuador.
- Martínez, M., & Gaju, N. (Mayo de 2005). El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo. *Ecosistemas*, 14(2), 79-87. Obtenido de <http://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/viewFile/156/153>.
- Martínez, V., & López, F. (abril de 2001). Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso, 9-10. México. Obtenido de <http://www.chapingo.mx/terra/contenido/19/1/art9-17.pdf>

- Meneses, R. (20 de Noviembre de 2014). Biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs en microcosmos de suelo a campo abierto, 2-36. Cuenca, Azuay, Ecuador.
- Microgen bioproducts. (07 de 2007). Microgen GnA+B-ID System. Obtenido de [www.microgenbioproducts.com](http://www.microgenbioproducts.com)
- Ministerio de Hidrocarburos. (29 de Septiembre de 2010). Decreto Ejecutivo 1215 Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas (RAOHE). Quito, Pichincha, Ecuador.
- Mínisterio de la Presidencia. (2005). Real decreto 9. España. Obtenido de <https://www.boe.es/boe/dias/2005/01/18/pdfs/A01833-01843.pdf>
- Ministerio del Interior. (2013). Plan Nacional de Desarrollo. Plan Nacional para el Buen Vivir 2013-2017, 322-504. Quito, Pichincha, Ecuador: Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo – Senplades.
- Montoya, A., & Ochoa, D. (29 de Noviembre de 2010). Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias, 18(2), 60. Colombia. Obtenido de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-68052010000200004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-68052010000200004&script=sci_arttext)
- Morales, E. (7 de Noviembre de 2014). Unidad II: Microbiología y fisicoquímica de suelos y aguas. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Norris, Hinchee, Brown, Mccarty, Semiprini, Wilson, . . . Ward. (1993). Handbook of biorremediation. Lewis Publishers.
- Ñustez, D. (Mayo de 2012). Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible, 18-22. Pereira, Colombia.
- Oliveira, J., Afif, E., & Mayor, M. (2006). Análisis de suelos y plantas y recomendaciones de abonado. Ediciones de la Universidad de Oviedo.
- Osorio, R. (Agosto de 2010). Estudios del efecto de *Trichoderma harzianum* en el control de *Moniliophthora roreri* en plantas de *Theobroma cacao* en la provincia de Esmeraldas, 36. Quito, Pichincha, Ecuador. Obtenido de <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/2339/1/CD-3088.pdf>
- Osuji, L., & Opiah, U. (2007). Hydrocarbon contamination of a terrestrial ecosystem: the case of Oshire-1 oil spill in Niger Delta, Nigeria. *Environmentalist* 27, 337-340.
- Pardo, J., Perdomo, M., & Benavides, J. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. Bogotá, Colombia.
- Quistián, H. (29 de octubre de 2014). Microbiología. Obtenido de Metabolismo bacteriano: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/metabolismo-bacteriano.html>

- Raiger, L., & López, N. (2009). Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Química Viva*(3), 146-161.
- Riojas, H., Torres, L., Mondaca, I., Balderas, J., & Gortáres, P. (diciembre de 2010). Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Química Viva*, 9(3), 124-128. Obtenido de [https://www.researchgate.net/profile/Luis\\_Torres7/publication/50285620\\_Efectos\\_de\\_los\\_surfactantes\\_en\\_la\\_biorremediacion\\_de\\_suelos\\_contaminados\\_con\\_hidrocarburos/links/53dfd7370cf2a768e49bec94.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Luis_Torres7/publication/50285620_Efectos_de_los_surfactantes_en_la_biorremediacion_de_suelos_contaminados_con_hidrocarburos/links/53dfd7370cf2a768e49bec94.pdf)
- Rivera, C. (2011). Tratamiento físico-biológico para la recuperación del suelo y el pantano afectados por el derrame de petróleo de la línea de flujo del pozo Shushuqui 13, 13-36. Ibarra, Imbabura, Ecuador.
- Rodríguez, H., & Rodríguez, J. (2011). Métodos de análisis de suelos y plantas; Criterios de interpretación. Trillas.
- Ron, E., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation, 249-251.
- Santambrosio, E., Ortega, M., & Garibaldi, P. (2009). Trabajo practivo # 4. Tinción y observación de microorganismos. Obtenido de [http://www.fro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5\\_anio/biotecnologia/practico4.pdf](http://www.fro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practico4.pdf)
- Semple, K. T., Rcid, B. J., & Fermor, T. R. (2001). impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants, 270-271.
- Servicios Analíticos Generales S.A.C. (2016). Análisis de la calidad del suelo. Obtenido de Hidrocarburos Totales de Petróleo: [http://www.sagperu.com/tph\\_suelos.html](http://www.sagperu.com/tph_suelos.html)
- SlidePlayer. (2015). Obtenido de <http://slideplayer.com/slide/3922362/>
- Somos Químicos. (09 de Octubre de 2009). Obtenido de <http://somosquimicos.blogspot.com/2009/10/petroleo.html>
- Torres, K., & Zuluaga, T. (2009). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, 42-45. Medellín, Colombia.
- Tulas, Libro VI, anexo 2. (2012). Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados, 250-366.
- Varela, G. (2011). Obtenido de Fisiología y metabolismo bacteriano. Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2011.pdf>
- Vargas, S. (2012). Microorganismos solubilizadores de fosfato en suelos, 15-60. Bucaramanga.
- Vásquez, J. (12 de Noviembre de 2012). SlideShare. Obtenido de <http://es.slideshare.net/Californio89js/ruta-de-las-pentosas-fosfato>.
- Vega, R. (Septiembre de 2011). Selección, caracterización y evaluación de hongos potencialmente utilizables en biorremediación de suelos y aguas contaminadas con hidrocarburos a nivel de laboratorio, a partir de muestras de suelo de la parroquia San Carlos, provincia de Orellana, 20. Sangolquí, Ecuador. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/4595/1/T-ESPE-032726.pdf>

- Volke, T. (2002). Biorremediación de suelos contaminados, 25. México. Obtenido de [http://www.smbb.com.mx/revista/Revista\\_2002\\_1/biorremediacion.pdf](http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2002_1/biorremediacion.pdf)
- Wessner, D., Dupont, C., & Charles, T. (2013). Microbiology.
- Wick, A., Haus, N., Sukkariyah, B., Haering, K., & Daniels, W. L. (2011). Virginia polytechnic institute and state university, department of crop and soil environmental sciences Blacksburg. Remediation of PAH-Contaminated Soils and Sediments: A Literature Review, 24. Virginia.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2009). Microbiología de Prescott, Harley y Klein. Sevilla: Doosan.
- Yañez, G., & Wong, A. (2013). Biosurfactantes microbianos, producción potencial con residuos agroindustriales de Chiapas. *BioTecnología*, 17(3), 13-14. Obtenido de [http://www.smbb.com.mx/revista/Revista\\_2013\\_3/biosurfactantes.pdf](http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2013_3/biosurfactantes.pdf)

# **Anexos**

# Anexo 1. Resultados de los análisis físico químicos y TPH

## 1A. Resultados de análisis físico químico



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA  
**SALESIANA**  
ECUADOR LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA



Cliente: MUÑOZ CUAICAL STALIN MUÑOZ  
Dirección: Carcelén - Quito  
Contacto: Ing. Agr. Huachi Laura  
Cantidad de muestras: 1  
Fecha de Ingreso: 03/09/2015  
Nº de Informe: 15-345  
Identificación de Usuario: PUEMBO-01

Tel./Cel: 099-897-4711  
E-mail: [smunozc@est.ups.edu.ec](mailto:smunozc@est.ups.edu.ec)  
Tipo de Cultivo: Niguno  
Fecha Emisión: 09/09/2015  
Total de pag. 1  
Código de Laboratorio: SA-15-645

### INFORME DE RESULTADOS

pH	C.E.	M.O.	N-Total	P	K	Ca	Mg	Na	S
uds	dS/cm	%	%	mg/L	meq/100g	meq/100g	meq/100g	meq/100g	mg/L
6,53 OK	4,32 A	11,6 A	0,58 A	0,01 B	8,95 A	9,49 OK	4,68 A	0,50 OK	8,27 B

B	Fe	Mn	Cu	Zn	RELACIONES				CÍCE
					Fe/Mn	Ca/Mg	Mg/K	Ca+Mg/K	
0,54 B	50,25 OK	11,1 OK	1,83 OK	0,00 B	4,53 B	2,03 OK	0,52 B	4,96 B	23,63 OK

TEXTURA (%)		
ARENA	LIMO	ARCILLA
82	18	0
ARENA FRANCA		

Método Análisis: P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Cu, Zn - Ácido Itálico; Olsen Modificado, Ca, Mg, K, Na - Intercambiables; Acetato de Amonio, pH 1:1,25 H<sub>2</sub>O, Pasta Saturada; Conductividad Eléctrica, S, B, Mat. Orgánica 0.1-0.5 K<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 6.8 N, Textura Hidrómetro Hazen.

### Interpretación

A: alto; B: bajo; OK: adecuado  
usd: unidades; mg/L: miligramos por litro

Nota Aclaratoria: Los resultados corresponden únicamente a las muestras entregadas por el cliente.

Ing. Agr. Orlando Gualavisi  
Técnico de Suelos y Agua

Quím. D<sup>a</sup> Jim. Paola Simbaña  
Responsable de Laboratorio

Página 1; copia 1



LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarín N395 y 9 de Octubre. Teléfonos: (593) 2 3962 946 / 3962 800 ext. 2504  
Correo electrónico: [ogualavisi@ups.edu.ec](mailto:ogualavisi@ups.edu.ec) / [bioagrolab@ups.edu.ec](mailto:bioagrolab@ups.edu.ec)

**LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA**

**Cliente:** MUÑOZ CUAICAL STALIN DAVID

**Dirección:** Carcelén - Quito

**Contacto:** Ing. Agr. Laura Huachi

**Cantidad de muestras:** 1

**Fecha de Ingreso:** 12/02/2016

**Nº de Informe:** 16133

**Telf./Cel:** 099-897-4711

**E-mail:** smunozc@est.ups.ec

**Tipo de Cultivo:** Sin Cultivo

**Fecha Emisión:** 04/03/2016

**Total de pag. 1**

**Identificación de Usuario**

MUESTRA INICIAL 10

**Código de Laboratorio**

LSA16-91

**INFORME DE RESULTADOS**

pH	C.E.	M.O.	N-Total	P	K	Ca	Mg	Na	S
uds	mS/cm	%	%	ppm	meq/100g	meq/100g	meq/100g	meq/100g	ppm
7,17 A	0,32 B	10,66 A	0,53 A	0,00 B	1,18 OK	14,80 OK	3,35 OK	0,27 OK	8,20 B

B	Fe	Mn	Cu	Zn	RELACIONES				CICE
					Fe/Mn	Ca/Mg	Mg/K	Ca+Mg/K	
0,42 B	97,44 OK	19,66 OK	13,22 A	12,94 A	4,96	4,42 OK	2,85 OK	42,15 A	19,60 OK

**Origen del criterio de valoración:**

Estación Experimental Pichilingue-INIAP, 2012

**Método de análisis:**

P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Cu, Zn - Asimilables: Olsen Modificado;

Ca, Mg, K, Na - Intercambiables: Acetato de Amonio;

Conductividad Eléctrica- pH 1: 1,25 H<sub>2</sub>O;

Pasta Saturada: Conductividad Eléctrica, S, B;

Materia Orgánica: 0.1-0.5 K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.8 N

TEXTURA (%)		
ARENA	LIMO	ARCILLA
76	20	4
FRANCO ARENOSO		

**Simbología**

A: alto; B: bajo; OK: adecuado

mg/L: miligramos por litro; meq/100g: miliequivalentes por cien gramos

usd: unidades; %: porcentaje

**Nota Aclaratoria:** Los resultados corresponden únicamente a las muestras entregadas por el cliente.



Ing. Agr. Orlando Gualavisi  
Técnico de Suelos y Agua



Quim. De Anál. Paola Simbaña  
Responsable de Laboratorio

Página 1; copia 1

LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N395 y 9 de Octubre. Teléfonos: (593) 2 3962 946 / 3962 800 ext. 2504  
Correo electrónico: ogualavisi@ups.edu.ec / bioagrolab@ups.edu.ec

**LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA**

Cliente: MUÑOZ CUAICAL STALIN DAVID

Dirección: Carcelén - Quito

Contacto: ...

Cantidad de muestras: 1

Fecha de Ingreso: 04/03/2016

Nº de Informe: 16141

Tel./Cel: 099-897-4711

E-mail: smunozc@est.ups.ec

Tipo de Cultivo: Sin Cultivo

Fecha Emisión: 10/03/2016

Total de pag. 1

Identificación de Usuario

TI MED. (Trichoderma)

Código de Laboratorio

LSA16-185

**INFORME DE RESULTADOS**

pH	C.E.	M.O.	N-Total	P	K	Ca	Mg	Na	S
uds	dS/cm	%	%	ppm	meq/100g	meq/100g	meq/100g	meq/100g	ppm
7,20 A	2,16 A	10,0 A	0,50 A	11,00 B	1,43 OK	15,12 A	3,72 OK	0,58 OK	8,00 B

B	Fe	Mn	Cu	Zn	RELACIONES				CICE
mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	Fe/Mn	Ca/Mg	Mg/K	Ca+Mg/K	meq/100g
0,01 B	87,93 OK	2,01 B	23,10 A	14,37 A	43,75 A	4,06 OK	2,60 OK	39,29 A	20,86 OK

TEXTURA (%)		
ARENA	LIMO	ARCILLA
72	24	4
ARENA FRANCA		



Método Análisis: P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Cu, Zn - Asimilables: Olsen Modificado; Ca, Mg, K, Na - Intercambiables: Acetato de Amonio; pH 1-1,25 H2O; Pasta Santrada: Conductividad Eléctrica, S, B; Mat. Orgánica: 0,1-0,5 KCN/207 0,8 N; Textura: Hidrómetro Bouyoucos.

**Interpretación**

A: alto; B: bajo; OK: adecuado

uds: unidades; mg/L=ppm: miligramos por litro ó partes por millón

Nota Aclaratoria: Los resultados corresponden únicamente a las muestras entregadas por el cliente.

  
Ing. Agr. Orlando Gualavisi  
Técnico de Suelos y Agua

  
Quím. De Alim Paola Simbaña  
Responsable de Laboratorio

Página 1; copia 1

LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N395 y 9 de Octubre. Teléfonos: (593) 2 3962 946 / 3962 800 ext. 2504  
Correo electrónico: ogualavisi@ups.edu.ec / bioagrolab@ups.edu.ec

LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Ciente: MUÑOZ CUAICAL STALIN DAVID

Dirección: Carcelén - Quito  
 Contacto: Ing. Laura Huachi  
 Cantidad de muestras: 1  
 Fecha de Ingreso: 04/03/2016  
 N° de Informe: 16142

Telf./Cel: 099-897-4711  
 E-mail: smunozc@est.ups.ec  
 Tipo de Cultivo: Sin Cultivo  
 Fecha Emisión: 10/04/2015  
 Total de pag. 1

Identificación de Usuario T2 MED.(Pseudomona) Código de Laboratorio LSA16-186

INFORME DE RESULTADOS

pH	C.E.	M.O.	N-Total	P	K	Ca	Mg	Na	S
uds	mS/cm	%	%	ppm	meq/100g	meq/100g	meq/100g	meq/100g	ppm
6,87 OK	1,49 OK	9,14 A	0,46 A	2,46 B	1,13 OK	14,60 OK	3,50 OK	0,55 OK	14,80 OK

B	Fe	Mn	Cu	Zn	RELACIONES				CICE
mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	Fe/Mn	Ca/Mg	Mg/K	Ca+Mg/K	meq/100g
0,01 B	75,73 OK	18,00 OK	24,50 A	0,94 B	4,21	4,18 OK	3,11 OK	45,39 A	19,78 OK

Origen del criterio de valoración:

Estación Experimental Pichilingue-INIAP, 2012

Método de análisis:

P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Cu, Zn - Asimilables: Olsen Modificado;

Ca, Mg, K, Na - Intercambiables: Acetato de Amonio;

Conductividad Eléctrica- pH 1:1,25 H<sub>2</sub>O;

Pasta Saturada: Conductividad Eléctrica, S, B;

Materia Orgánica:0.1-0.5 K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.8 N

TEXTURA (%)		
ARENA	LIMO	ARCILLA
72	26	2
ARENA FRANCA		

Simbología

A: alto; B: bajo; OK: adecuado

mg/L: miligramos por litro; meq/100g: miliequivalentes por cien gramos

usd: unidades; %: porcentaje

Nota Aclaratoria: Los resultados corresponden únicamente a las muestras entregadas por el cliente.



Ing. Agr. Orlando Gualavisi  
Técnico de Suelos y Agua



Quím. Da Alma Paola Simbaña  
Responsable de Laboratorio

Página 1; copia 1

LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N395 y 9 de Octubre. Teléfonos: (593) 2 3962 946 / 3962 800 ext. 2504  
 Correo electrónico: ogualavisi@ups.edu.ec / bioagrolab@ups.edu.ec

**LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA**

**Ciente:** MUÑOZ CUAICAL STALIN DAVID

**Dirección:** Carcelén - Quito  
**Contacto:** Ing. Agr. Laura Huachi  
**Cantidad de muestras:** 1  
**Fecha de Ingreso:** 04/03/2016  
**Nº de Informe:** 16143

**Telf./Cel:** 099-897-4711  
**E-mail:** smunozc@est.ups.ec  
**Tipo de Cultivo:** Sin Cultivo  
**Fecha Emisión:** 10/04/2015  
**Total de pag.** 1

**Identificación de Usuario**

T3 MED.(Trichoderma +  
Pseudomona)

**Código de Laboratorio**

LSA16-187

**INFORME DE RESULTADOS**

pH	C.E.	M.O.	N-Total	P	K	Ca	Mg	Na	S
uds	mS/cm	%	%	ppm	meq/100g	meq/100g	meq/100g	meq/100g	ppm
6,63 OK	3,34 A	9,24 A	0,46 A	1,32 B	1,18 OK	15,06 A	3,69 OK	0,63 OK	14,60 OK

B	Fe	Mn	Cu	Zn	RELACIONES				CICE
mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	Fe/Mn	Ca/Mg	Mg/K	Ca+Mg/K	meq/100g
0,04 B	146,81 OK	118,0 A	24,21 A	12,84 A	1,24 B	4,08 OK	3,14 OK	47,28 A	20,56 OK

**Origen del criterio de valoración:**

Estación Experimental Pichilingue-INIAP, 2012

**Método de análisis:**

P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Cu, Zn - Asimilables: Olsen Modificado;

Ca, Mg, K, Na - Intercambiables: Acetato de Amonio;

Conductividad Eléctrica-pH 1:1,25 H<sub>2</sub>O;

Pasta Saturada: Conductividad Eléctrica, S, B;

Materia Orgánica:0.1-0.5 K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.8 N

TEXTURA (%)		
ARENA	LIMO	ARCILLA
68	28	4
FRANCO ARENOSO		

**Simbología**

A: alto; B: bajo; OK: adecuado

mg/L: miligramos por litro; meq/100g: miliequivalentes por cien gramos

usd: unidades; %: porcentaje

**Nota Aclaratoria:** Los resultados corresponden únicamente a las muestras entregadas por el cliente.

  
Ing. Agr. Orlando Gualavisi  
Técnico de Suelos y Agua

  
Quim. De Alina Jaola Simbaña  
Responsable de Laboratorio

Página 1; copia 1

LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N395 y 9 de Octubre. Teléfonos: (593) 2 3962 946 / 3962 800 ext. 2504

Correo electrónico: o.gualavisi@ups.edu.ec / h.jaola@ups.edu.ec

**LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA**

**Cliente:** MUÑOZ CUAICAL STALIN DAVID

**Dirección:** Carcelén - Quito

**Contacto:** Ing. Agr. Laura Huachi

**Cantidad de muestras:** 1

**Fecha de Ingreso:** 03/05/2016

**Nº de Informe:** 16228

**Tel./Cel:** 099-897-4711

**E-mail:** smunozc@est.ups.ec

**Tipo de Cultivo:** ...

**Fecha Emisión:** 13/05/2016

**Total de pag. 1**

**Identificación de Usuario**

T0 (Suelo Testigo)

**Código de Laboratorio**

LSA16-257

**INFORME DE RESULTADOS**

pH	C.E.	M.O.	N-Total	P	K	Ca	Mg	Na	S
uds	mS/cm	%	%	ppm	meq/100g	meq/100g	meq/100g	meq/100g	ppm
7.23 A	0.41 B	10.25 A	0.51 A	4.50 B	1.30 OK	16.27 A	3.32 OK	0.27 OK	6.00 B

B	Fe	Mn	Cu	Zn	RELACIONES				CICE
mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	Fe/Mn	Ca/Mg	Mg/K	Ca+Mg/K	meq/100g
0.43 B	89.74 OK	5.1 B	6.94 A	8.33 OK	17.77 A	4.90 OK	2.54 OK	41.36 A	21.16 OK

*Origen del criterio de valoración:*

*Estación Experimental Pichilingue-INIAP, 2012*

*Método de análisis:*

*P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Cu, Zn - Asimilables: Olsen Modificado;*

*Cu, Mg, K, Na - Intercambiables: Acetato de Amonio;*

*Conductividad Eléctrica- pH 1: 1,25 H<sub>2</sub>O;*

*Pasta Saturada: Conductividad Eléctrica, S, B;*

*Materia Orgánica: 0.1-0.5 K<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.8 N*

TEXTURA (%)		
ARENA	LIMO	ARCILLA
74	24	2
FRANCO ARENOSO		

**Simbología**

A: alto; B: bajo; OK: adecuado

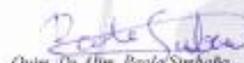
mg/L: miligramos por litro; meq/100g: miliequivalentes por cien gramos

uds: unidades; %: porcentaje

**Nota Aclaratoria:** Los resultados corresponden únicamente a las muestras entregadas por el cliente.



Ing. Agr. Orlando Gualavisi  
Técnico de Suelos y Agua



Quím. De Abn. Paola Sumbato  
Responsable de Laboratorio

Página 1: copia 1

LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N395 y 9 de Octubre. Teléfonos: (593) 2 3962 946 / 3962 800 ext. 2504

Correo electrónico: ogualavisi@ups.edu.ec / bioagrolab@ups.edu.ec

**LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA**

**Ciente:** MUÑOZ CUAICAL STALIN DAVID

**Dirección:** Carcelén - Quito

**Contacto:** Ing. Agr. Laura Huachi

**Cantidad de muestras:** 1

**Fecha de Ingreso:** 03/05/2016

**Nº de Informe:** 16229

**Tel./Cel:** 099-897-4711

**E-mail:** smunozc@est.ups.ec

**Tipo de Cultivo:** ...

**Fecha Emisión:** 13/05/2016

**Total de pag.:** 1

**Identificación de Usuario**

T1 (Suelo+Trichoderma)

**Código de Laboratorio**

LSA16-258

**INFORME DE RESULTADOS**

pH	C.E.	M.O.	N-Total	P	K	Ca	Mg	Na	S
uds	mS/cm	%	%	ppm	meq/100g	meq/100g	meq/100g	meq/100g	ppm
6,72 OK	7,80 A	10,66 A	0,53 A	47,68 OK	1,71 OK	16,41 A	3,71 OK	0,52 OK	3,20 B

B	Fe	Mn	Cu	Zn	RELACIONES				CICE
mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	Fe/Mn	Ca/Mg	Mg/K	Ca+Mg/K	meq/100g
0,32 B	98,97 OK	37,5 A	8,62 A	9,82 OK	2,64 B	4,42 OK	2,16 OK	35,51 A	22,35 OK

**Origen del criterio de valoración:**

Estación Experimental Pichilingue-INIAP, 2012

**Método de análisis:**

P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Cu, Zn - Asimilables: Olsen Modificado;

Ca, Mg, K, Na - Intercambiables: Acetato de Amonio;

Conductividad Eléctrica- pH 1:1,25 H<sub>2</sub>O;

Pasta Saturada: Conductividad Eléctrica, S, B;

Materia Orgánica: 0.1-0.5 K<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.8 N

**TEXTURA (%)**

ARENA	LIMO	ARCILLA
72	24	4
FRANCO ARENOSO		

**Símbología**

A: alto; B: bajo; OK: adecuado

mg/L: miligramos por litro; meq/100g: miliequivalentes por cien gramos

uds: unidades; %: porcentaje

**Nota Aclaratoria:** Los resultados corresponden únicamente a las muestras entregadas por el cliente.



Ing. Agr. Orlando Gualavisi  
Técnico de Suelos y Agua



Quím. B. Alva Paola Sumbano  
Responsable de Laboratorio



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA  
**SALESIANA**  
ECUADOR  
Laboratorio de suelos y de agua

Página 1; copia 1

LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N395 y 9 de Octubre. Teléfonos: (593) 2 3962 946 / 3962 800 ext. 2504  
Correo electrónico: ogualavisi@ups.edu.ec / biosol@lab@ups.edu.ec

**LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA**

Cliente: MUÑOZ CUAICAL STALIN DAVID

Dirección: Carcelén - Quito

Contacto: Ing. Agr. Laura Huachi

Cantidad de muestras: 1

Fecha de Ingreso: 03/05/2016

Nº de Informe: 16230

Tel./Cel: 099-897-4711

E-mail: smunozc@est.ups.ec

Tipo de Cultivo: ...

Fecha Emisión: 13/05/2016

Total de pag. 1

Identificación de Usuario

T2 (Suelo+Pseudomona)

Código de Laboratorio

LSA16-259

**INFORME DE RESULTADOS**

pH	C.E.	M.O.	N-Total	P	K	Ca	Mg	Na	S
uds	mS/cm	%	%	ppm	meq/100g	meq/100g	meq/100g	meq/100g	ppm
6,79 OK	4,69 A	9,04 A	0,45 A	56,21 OK	1,64 OK	15,75 A	3,45 OK	0,49 OK	23,20 OK

B	Fe	Mn	Cu	Zn	RELACIONES				CICE
					Fe/Mn	Ca/Mg	Mg/K	Ca+Mg/K	
0,41 B	89,38 OK	65,3 A	8,07 A	6,15 OK	1,37 B	4,56 OK	2,11 OK	33,21 A	21,33 OK

Origen del criterio de valoración:

Estación Experimental Pichilingue-INIAP, 2012

Método de análisis:

P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Cu, Zn - Asimilables: Olsen Modificado;

Ca, Mg, K, Na - Intercambiables: Acetato de Amonio;

Conductividad Eléctrica- pH 1: 1,25 H<sub>2</sub>O;

Pasta Saturada: Conductividad Eléctrica. S. B;

Materia Orgánica: 0.1-0.5 K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.8 N

TEXTURA (%)		
ARENA	LILO	ARCILLA
72	24	4
FRANCO ARENOSO		

**Simbología**

A: alto; B: bajo; OK: adecuado

mg/L: miligramos por litro; meq/100g: miliequivalentes por cien gramos

uds: unidades; %: porcentaje

**Nota Aclaratoria:** Los resultados corresponden únicamente a las muestras entregadas por el cliente.



Ing. Agr. Orlando Guatavisi  
Técnico de Suelos y Agua



Responsable de Laboratorio

Página 1; copia 1

LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N395 y 9 de Octubre. Teléfonos: (593) 2 3962 946 / 3962 800 ext. 2504  
Correo electrónico: ogualavisi@ups.edu.ec / bioagrolab@ups.edu.ec

**LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA**

**Cliete:** MUÑOZ CUAICAL STALIN DAVID

**Dirección:** Carcelén - Quito  
**Contacto:** Ing. Agr. Laura Huachi  
**Cantidad de muestras:** 1  
**Fecha de Ingreso:** 03/05/2016  
**Nº de Informe:** 16231

**Tel./Cel:** 099-897-4711  
**E-mail:** smunozc@est.ups.ec  
**Tipo de Cultivo:** ...  
**Fecha Emisión:** 13/05/2016  
**Total de pag.** 1

**Identificación de Usuario**

T3 (Suelo+Trichoderma+  
Pseudomona)

**Código de Laboratorio**

LSA16-260

**INFORME DE RESULTADOS**

pH	C.E.	M.O.	N-Total	P	K	Ca	Mg	Na	S
uds	mS/cm	%	%	ppm	meq/100g	meq/100g	meq/100g	meq/100g	ppm
6,91 OK	7,75 A	9,58 A	0,48 A	43,82 OK	1,53 OK	15,90 A	3,51 OK	0,55 OK	23,60 OK

B	Fe	Mn	Cu	Zn	RELACIONES				CICE
					Fe/Mn	Ca/Mg	Mg/K	Ca+Mg/K	
0,40 B	98,50 OK	86,6 A	9,31 A	8,11 OK	1,14 B	4,53 OK	2,29 OK	36,37 A	21,50 OK

**Origen del criterio de valoración:**  
Estación Experimental Pichilingue-INIAP, 2012  
**Método de análisis:**  
P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Cu, Zn - Asimilables: Olsen Modificado;  
Ca, Mg, K, Na - Intercambiables: Acetato de Amonio;  
Conductividad Eléctrica- pH 1:1,25 H<sub>2</sub>O;  
Pasta Saturada: Conductividad Eléctrica, S. B;  
Materia Orgánica: 0.1-0.5 K<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.8 N

TEXTURA (%)		
ARENA	LILO	ARCILLA
66	28	6
FRANCO ARENOSO		

**Simbología**

A: alto; B: bajo; OK: adecuado  
mg/L: miligramos por litro; meq/100g: miliequivalentes por cien gramus  
uds: unidades; %: porcentaje

**Nota Aclaratoria:** Los resultados corresponden únicamente a las muestras entregadas por el cliente.



Ing. Agr. Orlando Cuadros  
Técnico de Suelos y Agua



Quim. De Alm. Piedad Sotoca  
Responsable de Laboratorio

Página 1: copia 1

LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N395 y 9 de Octubre. Teléfonos: (593) 2 3962 946 / 3962 800 ext. 2504  
Correo electrónico: ogualavisi@ups.edu.ec / bioagrolab@ups.edu.ec

## 1B. Resultados de análisis de TPH



**CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES  
CENTROCESAL Cia. Ltda.**

**AREA QUÍMICA**

**INFORME DE ENSAYO No.:** 17530-01-22-03-16-Q

**Empresa:** MUÑOZ CUAICAL STALIN DAVID  
**Nombre de representante:** Stalin Muñoz  
**Dirección:** Carcelén  
**Teléfono:** 0 988974711 **FAX:**  
**Identificación de la muestra:** SUELO  
**Descripción de la muestra:** Sólido de color café oscuro.  
**Contenido declarado:** 500 g  
**No. de Lote o código:** ND  
**Fecha de elaboración:** ND **Fecha de caducidad:** ND

**Muestreo:** Por el cliente **Fecha de toma de muestra:** ND  
**Fecha de recepción:** 22-mar-2016  
**Fecha de ensayo:** 24-mar al 07 abr-2016  
**Fecha de reporte:** 08-abr-16

**Resultados analíticos:**

**Pag.:**   1   de   1  

Parámetro	Método	Unidades	Resultado
Cadmio (Cd)	EPA 7130	mg/kg	<0.01
Níquel (Ni)	EPA 7520	mg/kg	12.8
Plomo (Pb)	EPA 7420	mg/kg	3.0
TPH	EPA 8015	mg/kg	42070.3

**Lcdo. Daniel Diaz**  
CENTROCESAL Cia. Ltda.

Responsable de Análisis



**Q.F. Andrea Cumbaja**  
CENTROCESAL Cia. Ltda.

Responsable de Supervisión

**Notas:**

ND: No declara

NA: No aplica

Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.  
 Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis.  
 Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL, Cia. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.  
 La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio  
 y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecde a los límites de una especificación.

Inf./POC/5.10.1 Rev. 03 Anexo 1

**Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio**

Av. Análisis 501-250 y Av. Martín de Jesús  
 Telf: (593 2) 2216342 / 2232782  
 Fax: Ext. 162 Celular: 99849872  
 e-mail: info@centrocesal.com  
 www.centrocesal.com  
 QUITO - ECUADOR



**CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES  
CENTROCESAL Cia. Ltda.**

**AREA QUÍMICA**

**INFORME DE ENSAYO No.:** 17570-01-29-03-16-QA  
**Suplemento al informe de ensayo:** 17570-01-29-03-16-Q  
**Empresa:** MUÑOZ GUAICAL STALIN DAVID  
**Nombre de representante:** Stalin Muñoz  
**Dirección:** Carcelén  
**Teléfono:** 0 996974711 **FAX:**  
**Identificación de la muestra:** TO TESTIGO  
**Descripción de la muestra:** Sólido de color café oscuro.  
**Contenido declarado:** 500 g  
**No. de Lote o código:** ND  
**Fecha de elaboración:** ND **Fecha de caducidad:** ND  
**Muestreo:** Por el cliente **Fecha de toma de muestra:** ND  
**Fecha de recepción:** 29-mar.-2016  
**Fecha de ensayo:** 29-mar al 07-abr-2016  
**Fecha de reporte:** 8-Abr-16

**Resultados analíticos:**

**Pag.:** 1 de 1

Parámetro	Método	Unidades	Resultado
Cadmio (Cd)	EPA 7130	mg/kg	<0.01
Níquel (Ni)	EPA 7520	mg/kg	8.7
Plomo (Pb)	EPA 7420	mg/kg	3.7
TPH	EPA 8010	mg/kg	30647.2

**Lcdo. Daniel Díaz**  
 CENTROCESAL Cia. Ltda.  
 Responsable de Análisis



**Q.F. Andrea Cumba A.**  
 CENTROCESAL Cia. Ltda.  
 Responsable de Supervisión

**Notas:**

**ND:** No declara  
**NA:** No aplica

Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.  
 Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis.  
 Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cia. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.  
 La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.

Int. PCE 5 11.1 Rev. 05 Anexo 1

**Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio**

Av. Baetica 301-323 y Av. Mariana de Jesús  
 Telf: (593) 2 2230940 / 2103780  
 Fax: Ecu, 183 Celular: 099498119  
 e-mail: info@centrocesal.com  
 www.centrocesal.com  
 QUITO - ECUADOR



**CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES  
CENTROCESAL Cia. Ltda.**

**AREA QUIMICA**

**INFORME DE ENSAYO No.:** 17570-02-29-03-16-Q

**Empresa:** MUÑOZ CUAICAL STALIN DAVID  
**Nombre de representante:** Stalin Muñoz  
**Dirección:** Carcelén  
**Teléfono:** 0 99974711 **FAX:**  
**Identificación de la muestra:** T1 TRICHODERMA  
**Descripción de la muestra:** Sólido de color café oscuro.  
**Contenido declarado:** 500 g  
**No. de Lote o código:** ND  
**Fecha de elaboración:** ND **Fecha de caducidad:** ND

**Muestreo:** Por el cliente **Fecha de toma de muestra:** ND  
**Fecha de recepción:** 29-mar-2016  
**Fecha de ensayo:** 29-mar al 07 abr-2016  
**Fecha de reporte:** 08-abr-16

**Resultados analíticos:** Pag.: 1 de 1

Parámetro	Método	Unidades	Resultado
Cadmio (Cd)	EPA 7130	mg/kg	<0.01
Níquel (Ni)	EPA 7520	mg/kg	8.8
Plomo (Pb)	EPA 7420	mg/kg	3.9
TPH	EPA 8015	mg/kg	18782.6

*Lcdo. Daniel Diaz*  
CENTROCESAL Cia. Ltda.  
Responsable de Análisis



*Andrés Cumbal*  
Responsable de Supervisión

**Notas:**

ND: No declara

NA: No aplica

Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.

Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis.

Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL, Cia. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.

La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio y será informada cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.

Form. PCE-5.12 / Rev. 06 / Anexo 1

**Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio**

Av. Andina N°1.232 y Av. Mariscal de Jesús  
TEL: (091 2) 2230342 / 2233782  
Fax: Ext. 103. Celular: 099668872  
e-mail: [info@centrocesal.com](mailto:info@centrocesal.com)  
[www.centrocesal.com](http://www.centrocesal.com)  
QUITO - ECUADOR



**CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES  
CENTROCESAL Cia. Ltda.**

**AREA QUÍMICA**

**INFORME DE ENSAYO No.:** 17570-03-29-03-16-Q

**Empresa:** MUÑOZ CUAICAL STALIN DAVID  
**Nombre de representante:** Stalin Muñoz  
**Dirección:** Carcelén  
**Teléfono:** 0 998974711 **FAX:**  
**Identificación de la muestra:** T2 PSEUDOMONA  
**Descripción de la muestra:** Sólido de color café oscuro.  
**Contenido declarado:** 500 g  
**No. de Lote o código:** ND  
**Fecha de elaboración:** ND **Fecha de caducidad:** ND

**Muestreo:** Por el cliente **Fecha de toma de muestra:** ND  
**Fecha de recepción:** 29-mar-2016  
**Fecha de ensayo:** 29-mar al 07 abr-2016  
**Fecha de reporte:** 08-abr-16

**Resultados analíticos:** Pag:  1  de  1

Parámetro	Método	Unidades	Resultado
Cadmio (Cd)	EPA 7130	mg/kg	<0.01
Niquel (Ni)	EPA 7520	mg/kg	7.9
Piomo (Pb)	EPA 7420	mg/kg	3.5
TPH	EPA 8015	mg/kg	15473.7

**Lcdo. Daniel Diaz**  
CENTROCESAL Cia. Ltda.

Responsable de Análisis



**Q.F. Andrea Cumbal A.**  
CENTROCESAL Cia. Ltda.  
Responsable de Supervisión

**Notas:**

ND: No declara  
NA: No aplica

Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.  
Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis.  
Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cia. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.  
La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.

Incl. POC 5.10.1 Rev. 00 Anexo 1

**Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio**

Av. Andriana N31-242 y Av. Mariana de Jesús  
Tel: (051 2) 2233543 / 2233782  
Fax: Ext. 182 Cakalar, 099649872  
e-mail: info@centrocesal.com  
www.centrocesal.com  
QUITO - ECUADOR



CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES  
CENTROCESAL Cia. Ltda.

AREA QUÍMICA

**INFORME DE ENSAYO No.:** 17570-04-29-03-16-Q

**Empresa:** MUÑOZ CUAICAL STALIN DAVID  
**Nombre de representante:** Stalin Muñoz  
**Dirección:** Carcelén  
**Teléfono:** 0 998974711 **FAX:**  
**Identificación de la muestra:** T3 CONSORCIO  
**Descripción de la muestra:** Sólido de color café oscuro.  
**Contenido declarado:** 500 g  
**No. de Lote o código:** ND  
**Fecha de elaboración:** ND **Fecha de caducidad:** ND

**Muestreo:** Por el cliente **Fecha de toma de muestra:** ND  
**Fecha de recepción:** 29-mar-2016  
**Fecha de ensayo:** 29-mar al 07 abr-2016  
**Fecha de reporte:** 08-abr-16

Resultados analíticos:

Pag.: 1 de 1

Parámetro	Método	Unidades	Resultado
Cadmio (Cd)	EPA 7130	mg/kg	<0.01
Niquel (Ni)	EPA 7520	mg/kg	9.3
Plomo (Pb)	EPA 7420	mg/kg	3.9
TPH	EPA 8015	mg/kg	17858.5

~~Lcdo. Daniel Diaz~~  
CENTROCESAL Cia. Ltda.

~~Responsable de Análisis~~



Q.F. Andrea Cumba  
CENTROCESAL Cia. Ltda.  
Andrea Cumba  
Responsable de Supervisión

**Notas:**

ND: No detectado

NA: No aplica

Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.

Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis.

Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cia. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.

La declaración sobre la incertidumbre de mediciones, se puede solicitar al laboratorio

y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.

Int. POC.5.10.1 Rev. 08 Anexo 1

**Este informe no podrá ser reproducido, parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio**

Av. América 101-232 y Av. Mariscal de Ayala

Teléfono: (001 2) 2336342 / 2337792

Fax: Ext. 90 Celular: 99848872

e-mail: info@centrocesal.com

www.centrocesal.com

QUITO - ECUADOR



**CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES  
CENTROCESAL Cia. Ltda.**

**AREA QUÍMICA**

**INFORME DE ENSAYO No.:** 17845-01-29-0416-Q

**Empresa:** MUÑOZ CUAICAL STALIN DAVID  
**Nombre de representante:** Stalin Muñoz  
**Dirección:** Carcelón  
**Teléfono:** 0 998974711 **FAX:**  
**Identificación de la muestra:** SUELO FINAL T0  
**Descripción de la muestra:** Sólido de color café oscuro.  
**Contenido declarado:** 500 g  
**No. de Lote o código:** ND  
**Fecha de elaboración:** ND **Fecha de caducidad:** ND

**Muestreo:** **Por el cliente** **Fecha de toma de muestra:** ND  
**Fecha de recepción:** 29-abr-2016  
**Fecha de ensayo:** 03/10-may-2016  
**Fecha de reporte:** 10-may-16

**Resultados analíticos:** **Pag.:** 1 de 1

Parámetro	Método	Unidades	Resultado
Cadmio (Cd)	EPA 7130	mg/kg	<0.01
Niquel (Ni)	EPA 7520	mg/kg	10.56
Plomo (Pb)	EPA 7420	mg/kg	3.21
TPH	EPA 8015	mg/kg	24152.4

**Lcdo. Daniel Diaz**  
CENTROCESAL Cia. Ltda.  
  
Responsable de Análisis



**Q.F Andrea Cumba A.**  
CENTROCESAL Cia. Ltda.  
  
Responsable de Supervisión

**Notas:**

**ND:** No declara

**NA:** No aplica

Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.

Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis

Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cia. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.

La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.

Trat. POE.5.10.1 Rev. 05 Anexo 1

**Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio**

Av. América N31-233 y Av. Mariana de Jesús  
Telfs: (593 2) 2230342 / 2233792  
Fax: Ext. 102 Celular: 099649872  
e-mail: [info@centrocesal.com](mailto:info@centrocesal.com)  
[www.centrocesal.com](http://www.centrocesal.com)  
QUITO - ECUADOR



**CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES**  
**CENTROCESAL Cía. Ltda.**

**AREA QUÍMICA**

**INFORME DE ENSAYO No.:** 17845-02-29-0416-Q

Empresa: **MUÑOZ CUAICAL STALIN DAVID**  
Nombre de representante: **Stalin Muñoz**  
Dirección: **Carcelén**  
Teléfono: **0 998974711** FAX:  
Identificación de la muestra: **SUELO FINAL T1 TRICHODERMA**  
Descripción de la muestra: **Sólido de color café oscuro.**  
Contenido declarado: **500 g**  
No. de Lote o código: **ND**  
Fecha de elaboración: **ND** Fecha de caducidad: **ND**

Muestreo: **Por el cliente** Fecha de toma de muestra: **ND**  
Fecha de recepción: **29-abr-2016**  
Fecha de ensayo: **03/10-may-2016**  
Fecha de reporte: **10-may-16**

**Resultados analíticos:** Pag.: 1 de 1

Parámetro	Método	Unidades	Resultado
Cadmio (Cd)	EPA 7130	mg/kg	<0.01
Niquel (Ni)	EPA 7520	mg/kg	11.05
Plomo (Pb)	EPA 7420	mg/kg	2.39
TPH	EPA 8015	mg/kg	714.11

**Lcdo. Daniel Diaz**  
CENTROCESAL Cía. Ltda.

Responsable de Análisis



**Q.F. Andrea Cumba A.**  
CENTROCESAL Cía. Ltda.

Responsable de Supervisión

**Notas:**

**ND:** No declara

**NA:** No aplica

Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.

Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis

Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cía. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.

La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.

Intf.:POE.5.10.1 Rev. 00 Anexo 1

**Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio**

Av. América N21-232 y Av. Mariana de Jesús  
Telfs: (593 2) 2220342 / 2233792  
Fax: Ext. 102 Celular: 099649872  
e-mail: [info@centrocesal.com](mailto:info@centrocesal.com)  
[www.centrocesal.com](http://www.centrocesal.com)  
QUITO - ECUADOR



**CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES  
CENTROCESAL Cia. Ltda.**

**AREA QUÍMICA**

**INFORME DE ENSAYO No.:** 17845-03-29-0416-Q

**Empresa:** MUÑOZ CUAICAL STALIN DAVID  
**Nombre de representante:** Stalin Muñoz  
**Dirección:** Carcelén  
**Teléfono:** 0 998974711 **FAX:**  
**Identificación de la muestra:** SUELO FINAL T2 + PSEUDOMONA  
**Descripción de la muestra:** Sólido de color café oscuro.  
**Contenido declarado:** 500 g  
**No. de Lote o código:** ND  
**Fecha de elaboración:** ND **Fecha de caducidad:** ND

**Muestreo:** **Por el cliente** **Fecha de toma de muestra:** ND  
**Fecha de recepción:** 29-abr-2016  
**Fecha de ensayo:** 03/10-may-2016  
**Fecha de reporte:** 10-may-16

**Resultados analíticos:** **Pag.:** 1 de 1

Parámetro	Método	Unidades	Resultado
Cadmio (Cd)	EPA 7130	mg/kg	<0.01
Niquel (Ni)	EPA 7520	mg/kg	11.02
Plomo (Pb)	EPA 7420	mg/kg	3.81
TPH	EPA 8015	mg/kg	396.1

Lcdo. Daniel Díaz  
CENTROCESAL Cia. Ltda.

Responsable de Análisis



Q.F. Andrea Cumba A.  
CENTROCESAL Cia. Ltda.

Responsable de Supervisión

**Notas:**

ND: No declara

NA: No aplica

Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.

Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis

Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cia. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.

La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.

Intef\_POE.5.10.1 Rev.06 Anexo 1

**Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio**

Av. América N31-232 y Av. Mariana de Jesús  
Telfs: (593 2 ) 2230342 / 2233792  
Fax: Ext. 102 Celular: 899449872  
e-mail: [info@centrocesal.com](mailto:info@centrocesal.com)  
[www.centrocesal.com](http://www.centrocesal.com)  
QUITO - ECUADOR



**CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES  
CENTROCESAL Cía. Ltda.**

**AREA QUÍMICA**

**INFORME DE ENSAYO No.:** 17845-04-29-0416-Q

**Empresa:** MUÑOZ CUAICAL STALIN DAVID  
**Nombre de representante:** Stalin Muñoz  
**Dirección:** Carcelén  
**Teléfono:** 0 998974711 **FAX:**  
**Identificación de la muestra:** SUELO FINAL T3 + CONSORCIO  
**Descripción de la muestra:** Sólido de color café oscuro.  
**Contenido declarado:** 500 g  
**No. de Lote o código:** ND  
**Fecha de elaboración:** ND **Fecha de caducidad:** ND

**Muestreo:** Por el cliente **Fecha de toma de muestra:** ND  
**Fecha de recepción:** 29-abr-2016  
**Fecha de ensayo:** 03/10-may-2016  
**Fecha de reporte:** 10-may-16

**Resultados analíticos:**

**Pag.:** 1 de 1

Parámetro	Método	Unidades	Resultado
Cadmio (Cd)	EPA 7130	mg/kg	<0.01
Niquel (Ni)	EPA 7520	mg/kg	10.51
Plomo (Pb)	EPA 7420	mg/kg	2.92
TPH	EPA 8015	mg/kg	379.2

**Lcdo. Daniel Díaz**  
CENTROCESAL Cía. Ltda.

Responsable de Análisis



**Q.F Andrea Cumba A.**

CENTROCESAL Cía. Ltda.

Responsable de Supervisión

**Notas:**

**ND:** No declara

**NA:** No aplica

Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.

Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis

Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cía. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.

La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio

y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.

Ref. POE.5.10.1 Rev.06 Anexo 1

**Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio**

Av. América N31-232 y Av. Mariluz de Jesús  
Telfs: (593 2) 2230342 / 2233752  
Fax: Ext. 102 Celular: 099649872  
e-mail: [info@centrocesal.com](mailto:info@centrocesal.com)  
[www.centrocesal.com](http://www.centrocesal.com)  
QUITO - ECUADOR

**Anexo 2. Procedimientos realizados para los análisis físicos químicos, TPH y preparación de agares del ensayo.**

**2A. Procedimientos realizados para los análisis físicos químicos.**

Análisis	Procedimientos
<p>Determinación de Nitrógeno total por: Técnica Kjeldahl</p>	<p><b>Materiales y equipos:</b> Balanza analítica, equipo Kjeldahl, manto calefactor, potenciómetro.</p> <p><b>Reactivos:</b> Ácido sulfúrico concentrado, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, NaOH al 15 %, solución de hidróxido de sodio al 30 %, solución de hidróxido de sodio 0.1 N, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> al 3 %, indicador de Tashiro, solución de HCl al 0.1 N.</p> <p><b>Procedimiento:</b> Realizar un prueba “blanco” mediante una sustancia sin nitrógeno, pesar 0.1 mg junto a 1 g de muestra nivelada en un matraz Kjeldahl, adicionar 3 esferas de vidrio, 10 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 g de CuSO<sub>4</sub> y 20 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, enlazar el matraz a la trampa de absorción de 250 mL de NaOH al 15 %, calentar hasta que la solución se torne transparente, dejar en ebullición por 20 min, si la muestra presenta espuma adicionar ácido esteárico y calentar, una vez enfriado adicionar 200 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Enlazar el matraz al sistema de destilación, adicionar 100 mL de NaOH al 30 %. Destilar 150 mL en un matraz que contenga refrigerante, agregar: 50 mL de una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 N, 5 gotas de rojo de metilo, 50 mL de agua destilada, agregar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para que se pueda realizar la retro</p>

	<p>titulación. Proceder a titular la cantidad se sobra de ácido con NaOH 0.1 N hasta que muestre u color amarillento.</p> <p><b>Cálculos</b></p> $\%N = \frac{14 \times N \times V_o \times 100}{\text{Mas} \times 1000}$ <p>Vol: 50 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 N</p> <p>Más: masa de la muestra (g)</p> <p>(Rodríguez &amp; Rodríguez, 2011, págs. 56-59)</p>
<p>Determinación de fósforo asimilable por: Técnica de Olsen modificado</p>	<p>Tamizar el suelo con un tamiz de 0.5 micrómetros.</p> <p><b>Para la extracción:</b> Pesar 5 g de suelo en un erlenmeyer de 125 mL en la balanza analítica y etiquetar la muestra. Después agregar 70 mL de la solución de bicarbonato de sodio por medio de una probeta. Pasar sobre el agitador por 30 minutos. Durante este tiempo, instalar los embudos sobre balones aforados de 100 mL. Filtrar la muestra, luego dejar escurrir y enjaguar l erlenmeyer, haciendo que pase el resto de la muestra sobre el filtro por medio de una piseta que contenga la solución extractora, manteniendo encima el filtro. Dejar escurrir completamente por medio de la solución, lavar el filtro, dejando escurrir bien. Realizar este procedimiento hasta obtener un volumen a 100 mL. Sacar el balón y aforarlo con la solución extractora o agua destilada. Tapar el balón y homogenizar por volteadas sucesivas.</p>

**Para la dilución:** Diluir la solución extraída al 1/100, se recomienda estar en la primera mitad de la gama al momento de la lectura, entre 0.1 y 0.6 ppm.

**Para la lectura:** Verter 40 ml de la solución diluida en un vaso de plástico de 50 mL, enjuagar bien y desechar. Después verter de nuevo alrededor de 20 mL de la solución de este vaso. Se tomó 10 mL de la solución diluida por medio de la pipeta automática e introducir en un tubo de ensayo que llevaba la numeración de la muestra y la dilución. Posteriormente adicionar 4 mL de ácido ascórbico de 1 % por medio de la pipeta automática de 5 mL arreglada a 4 mL y 2 mL de solución sulfo molibdica con el distribuidor automático. Agitar cada tubo alrededor de 5 segundos. Colocar en un baño María 15 minutos a 70 °C a fin de desarrollar la coloración azul. La coloración debe quedar estable durante 2 o 3 horas. Encender el baño María a una hora antes de esta operación, a fin de llegar a la temperatura deseada una vez que las muestras estén listas para pasarlas. Dejar enfriar en un baño de agua fría por un tiempo de 5 minutos. Preparar de manera idéntica a la gama patrón. Operar la toma de los diferentes volúmenes. Pasar las muestras a los tubos de colorimetría, verificando la perfecta limpieza de estos tubos. Efectuar la lectura en un colorímetro a 660 nm de la siguiente manera: El colorímetro debe de estar encendido una hora antes de la lectura para que este bien caliente, encerar y pasar la solución “blanco”, ajustar el ciento por ciento de transmisión.

Pasar los puntos de la gama, del más bajo al más alto, anotando la lectura obtenida por cada punto. Una vez hecho esto volver a pasar ahora las muestras y anotar las técnicas obtenidas. Una vez ubicada al medio de la serie, pasar de nuevo el punto 0.8 ppm de la gama a fin de verificar la buena calibración del colorímetro.

**Preparación de la gama patrón:** Preparar una “solución madre” de 1000 ppm de P a partir del fosfato de potasio monobásico una vez pasado por la estufa por 24 horas a 60 °C, luego meterlo en un desecador.

Pesar 4.40 en la balanza analítica y pasarlo a un balón aforado de 1000 mL, disolver y aforar con agua destilada. Partiendo de esta solución madre alistar diluciones: 100 ppm, 10 ppm y 1 ppm.

Verter 10 mL de la soluciones madre en un balón aforado de 100 mL. Completar y aforar con agua destilada

**Solución a 100 ppm:** vaciar 10 mL de la solución de 100 ppm en un balón aforado de 100 mL y aforarlo con agua destilada

**Solución a 10 ppm:** vaciar 10 mL de la solución a 10 ppm en un balón aforado de 100 mL y aforarlo con agua destilada

**Solución a 1 ppm** con las soluciones a 10 y 1 ppm, preparar:

0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.2	ppm
-----	-----	-----	-----	-----	---	-----	-----

Utilizar una bureta para verter 10 mL

0.1 ppm, verter 10 mL de la solución de 1 ppm

0.2 ppm, verter 10 mL de la solución de 1 ppm

0.4 ppm, verter 4 mL de la solución de 10 ppm

0.6 ppm, verter 6 mL de la solución de 10 ppm

	<p>0.8 ppm, verter 8 mL de la solución de 10 ppm</p> <p>1.0 ppm, verter 10 mL de la solución de 10 ppm</p> <p>1.2 ppm, verter 12 mL de la solución de 10 ppm</p> <p>Aforar completamente con agua destilada, agregar 1 mL de la solución extractante, aforar a 100 mL y etiquetar cada balón con la concentración de P correspondiente</p> <p><b>Controles:</b> preparar una muestra blanco para cada serie llevando todos los reactivos utilizados</p> <p><b>Cálculos:</b> realizar una curva a partir de las lecturas obtenidas en el colorímetro para cada punto</p> <p>Dar lectura a los resultados obtenidos en ppm</p> $\frac{\text{ppm leídos} \times \text{dilución} \times 100}{\text{peso de la muestra}} = \text{ppm de fósforo por 100 g de muestra}$ $\frac{\text{ppm por 100 g}}{10000} = \% \text{ de fósforo asimilable de muestra seca al aire}$ <p>Los resultados están generalmente expresados en P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> asimilable, para obtener datos de fósforo asimilable multiplicar</p> <p>2.29</p> <p>(Rodríguez &amp; Rodríguez, 2011, págs. 79-85)</p>
--	--

<p>Determinación potasio asimilable por: Técnica de Olsen modificado- fotometría de llama</p>	<p><b>Procedimiento:</b> Pesar 10 g de suelo en un erlenmeyer de 250 mL y añadir 100 mL de NH<sub>4</sub>OAc, luego dejar en reposo 24 horas. A continuación filtrar y tomar una alícuota de 10 mL. Dar lectura en el fotómetro de llama previamente calibrado en base de las curvas patrones.</p> <p><b>Cálculos:</b></p> $\frac{\frac{\text{me}}{\text{L}} \text{ en curva} \times 10}{\text{g muestra}} = K \left( \frac{\text{me}}{100 \text{ g}} \right)$ <p>(Rodríguez &amp; Rodríguez, 2011, págs. 79-85)</p>
---	--

<p>Determinación de calcio y magnesio asimilable por: Técnica de Olsen modificado- fotometría de absorción atómica</p>	<p><b>Perdidas de fuego.</b>- Pesar 0.5 g de muestra en la balanza analítica, dentro de un crisol de porcelana limpio, seco y tarado. Colocar un número de la muestra sobre el crisol. Introducir dentro de la mufla fría, y comenzar a subir gradualmente la temperatura hasta 480 °C y dejar por una hora. Apagar la mufla y dejar enfriar hasta una temperatura de alrededor de 120 °C. Luego pasar los crisoles que contienen las cenizas dentro de un desecador, posteriormente dejar enfriar y pesar. Finalmente conservar las cenizas para el cálculo del valor de los elementos minerales.</p> <p><b>Extracción.</b>- Agregar dentro del crisol de porcelana que contiene las cenizas, (una vez pesadas), en el orden siguiente; 2 mL de agua destilada, 1 mL de ácido clorhídrico concentrado P.A. Se deslizó sobre la plancha de calentamiento y llevar a secar lentamente. Una vez seca, enfriar y agregar de nuevo 2 mL de ácido clorhídrico. Preparar un embudo con su filtro sobre un balón aforado de 100 mL, y anotar la numeración del crisol. Luego se pasó el contenido del crisol sobre el filtro por medio de un chorro de agua. Enjuagar el crisol por medio de agua destilada a través de un chorro de agua, manteniéndole encima del filtro. Frotar las paredes del crisol con la ayuda de un “policía” y enjuagar con un chorro de piseta. Lavar bien el filtro con pequeños chorros de piseta. Repetir la operación cuatro o cinco veces, dejando escurrir bien. Retirar el balón aforado debajo del</p>
--	--

embudo y aforarlo a 100 mL con agua destilada. Tapar y homogenizar por volteadas sucesivas.

**Dilución y lectura.-** Efectuar dos diluciones diferentes, la una a 1 en 20 y la otra a 1 en 100, a fin de estar dentro de la escala de lectura del espectrofotómetro, además. Tomar 5 mL de la solución precedente, a través de una pipeta de precisión, introducir el contenido en un balón aforado a 100 mL, contenido 5 mL de solución de óxido de lantano al 1 %. Aforar a 100 mL con agua destilada, obteniendo así la dilución 1 en 20. Anotar en el balón el número de la muestra y la dilución. Tomar 10 mL de la solución 1/20 con una pipeta de precisión, luego introducir en un balón aforado de 50 mL que contenga 2.5 mL de la solución de óxido de lantano al 1%. Finalmente aforar a 50 mL con agua destilada, obteniendo la dilución a 1/100. Luego estas muestras pasar al espectrofotómetro.

**Calibración del espectrofotómetro.-** Según el manual de uso

**Lectura.-** Introducir el tubo de aspiración dentro del balón que contiene la muestra a dosificar, esperar la estabilización de la lectura y anotar la lectura obtenida. El resultado leído situar dentro de los dos primeros tercios de la curva de estandarización.

**Preparación de la gama patrón:** Utilizar las soluciones estándares a 1000 ppm de Ca y Mg para espectrofotometría, preparar soluciones a 500, 100, 10 y 1 ppm para cada elemento. Vaciar 50 mL de la solución estándar, por medio de una bureta

	<p>de 50 mL, en un balón aforado de 100 mL y aforar con agua destilada.</p> <p><b>Solución a 500 ppm:</b> Verter 20 mL de la solución a 500 ppm en un balón aforado de 100 mL y aforar con agua destilada</p> <p><b>Solución a 100 ppm:</b> Verter 10 mL de la solución a 100 ppm en un balón aforado de 100 mL y aforar con agua destilada.</p> <p><b>Solución a 10 ppm:</b> Verter 10 mL de la solución a 10 ppm en un balón aforado de 100 mL y aforar con agua destilada.</p> <p><b>Límites de lectura del espectrofotómetro.</b></p> <p>Ca: de 0.01 a 5 ppm</p> <p>Mg: de 0.003 a 1 ppm</p> <p><b>Controles:</b> preparar un testigo constituido por una muestra de concentración conocida.</p> <p><b>Cálculos:</b> El porcentaje obtenido se expresa en base a materia seca. Multiplicar los resultados obtenidos en la lectura (en ppm) por los factores siguientes.</p> <p>Para un peso de muestra de 0.5 g:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) Dilución 1/20 por 0.4</li><li>2) Dilución 1/100 por 2.0</li></ol> <p>(Rodríguez &amp; Rodríguez, 2011, págs. 79-85).</p>
--	--

Fuente: Adaptado de (Rodríguez & Rodríguez, 2011, págs. 56-127) por S. Muñoz (2016).

## 2B. Procedimientos realizados para los análisis de TPH.

Análisis	Procedimiento
Método EPA 8015D  TPH	<p>Este método se realiza mediante un cromatógrafo. Pesar 10 g de muestra para el spike, blanco y para la muestra. Para el blanco y el spike pesar 10 g de arena para cada uno. La extracción se efectuó con acetona y hexano. Mediante una micro jeringa se puso 200 µL de una solución de 100000 µton, para tener un resultado de 2000 ppm de diesel. Mediante un vortex agitar durante 15 minutos. Se situó 10 mL de acetona. Se ubicó 10 mL de hexano y se batió durante 20 minutos. Se centrifugó a 140 rpm por 3 minutos, con esto se completó la fase de extracción. Se puso agua desionizada hasta llenar los viales. Se dispuso en los viales del cromatógrafo 2 mL. El resultado se obtuvo alrededor de 45 minutos. Posteriormente se realizó el porcentaje de recuperación del subrogado (analito). Los TPH se hallan junto con el hexano.</p>

Nota: Tomado de EPA. 2016.

## 2C. Procedimientos para la preparación de los agares específicos.

Tipo de Agar	Procedimiento
PDA (Potato Agar Dextrosa)	Disolver 19.5 g del polvo en 500 mL de agua destilada y mezclar bien, mediante una plancha calentar el medio por 15 minutos con agitación frecuente, autoclavar a 121 ° C durante 15 minutos.
TSA (Trypticase Soy Agar):	Disolver 20 g del polvo en 500mL de agua destilada y mezclar bien, mediante una plancha calentar el medio por 15 minutos con agitación frecuente, autoclavar a 121 ° C durante 15 minutos.
SDA (Sabouraud Dextrose Agar)	Disolver 32.5 g del polvo en 500 mL de agua destilada y mezclar bien, mediante una plancha calentar el medio por 15 minutos con agitación frecuente, autoclavar a 121 ° C durante 15 minutos.
Cetrymide Agar	Agregar 5 mL de Glicerina a 500 mL de agua destilada, mezclar bien  Disolver 23 g del agar en los 500 mL de agua destilada con glicerina, mezclar bien, mediante una plancha calentar el medio por 15 minutos con agitación frecuente, autoclavar a 121 ° C durante 15 minutos.

Nota: Fuente Difco. (2015).

### Anexo 3. Fotografías del proyecto

#### 3A. Fase de campo



Muestreo de suelos para recolección  
muestras para análisis físico químico  
Elaborado por S. Muñoz, 2016.



Toma de muestras para el análisis  
microbiológico  
Elaborado por S. Muñoz, 2016.



Puntos de muestreo con sus respectivas  
muestras etiquetadas  
Elaborado por S. Muñoz, 2016.



Transporte de muestras mediante un  
cooler para análisis microbiológico  
Elaborado por S. Muñoz, 2016.

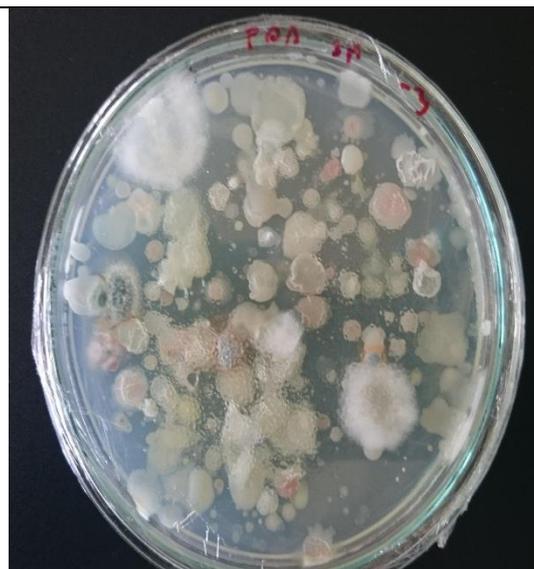
### 3B. Fase de Laboratorio.



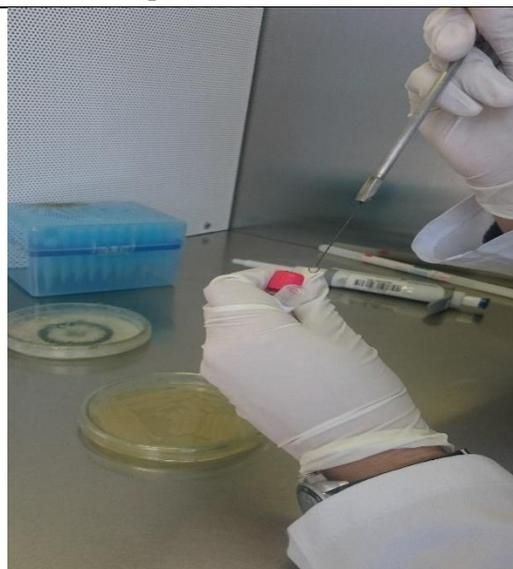
Elaboración de los medios de cultivo  
Elaborado por S. Muñoz, 2016.



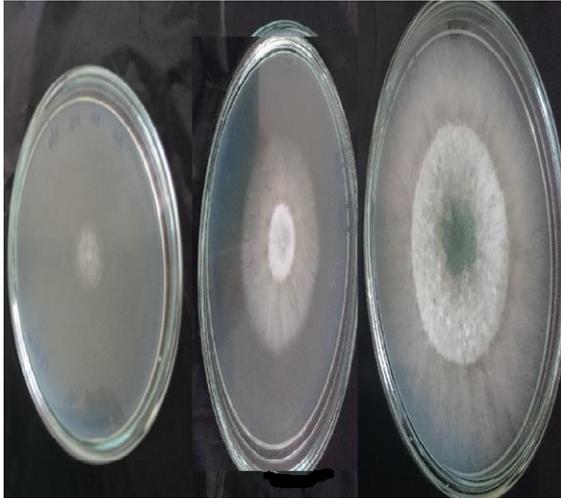
Caja con PDA con crecimientos de  
microorganismos por dilución  
Elaborado por S. Muñoz, 2016.



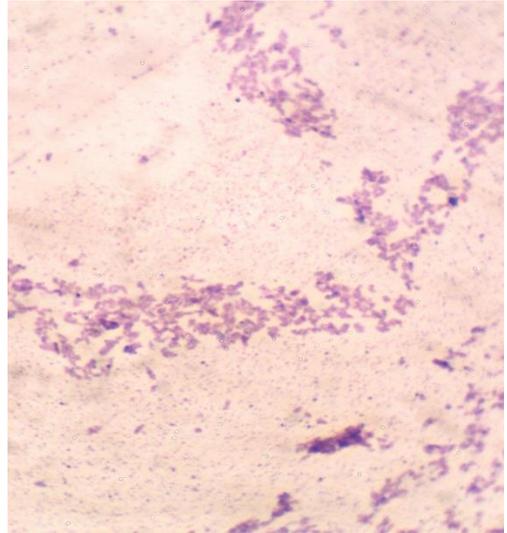
Caja con TSA con crecimientos de  
microorganismos por dilución  
Elaborado por S. Muñoz, 2016.



Conservación del hongo y la bacteria  
en Cryobank  
Elaborado por S. Muñoz, 2016.



Crecimiento de *Trichoderma* después de 72 h  
Elaborado por S. Muñoz, 2016.



Tinción gram de bacterias  
Elaborado por S. Muñoz, 2016.

**GN-ID A+B PANEL REPORT FORM**

Lab No. \_\_\_\_\_ Specimen Type: \_\_\_\_\_  
Date: 23-12-15

Well Number	GN A wells												GN B wells															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24				
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine	
Result	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	
Sum of Positive Reactions	6			0			4			2			2			1			0			0			0			

Octal Code: \_\_\_\_\_ Final Identification: \_\_\_\_\_

Formulario de Informe Microgen  
Elaborado por S. Muñoz, 2016.



Tira reactiva de Microgen para *Pseudomonas fluorescens*  
Elaborado por S. Muñoz, 2016.



Disposición de la tierra en las cajas  
Elaborado por S. Muñoz, 2016.



Adición de petróleo a las cajas con  
suelo  
Elaborado por S. Muñoz, 2016.



Adición del inculo a los tratamientos  
Elaborado por S. Muñoz, 2016.



Disposición de los tratamientos en  
iguales condiciones ambientales  
Elaborado por S. Muñoz, 2016.

Nota Elaborado por S. Muñoz. 2016.

### Anexo 4. Datos de variables

#### Anexo 4A. Datos de pH

	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>
<b>T0</b>	7.8	7.8	7.8	7.8
	7.34	7.29	7.19	7.22
	7.341	7.021	7.136	7.327
	7.22	7.18	7.2	7.1
	7.23	7.332	7.581	7.459
	7.15	7.2	7.1	7.08
	7.17	7.17	7.17	7.17
	7.08	7.021	7.114	7.13
	7.04	6.97	6.91	7.05
	6.8	6.8	6.79	6.77
	6.7	6.66	6.64	6.68
	6.75	6.6	6.418	6.955
	6.8	6.546	6.766	6.64
	6.63	6.69	6.7	6.7
	6.6	6.79	6.72	6.53
<b>T1</b>	7.8	7.8	7.8	7.8
	7.3	7.22	7.3	7.18
	7.25	7.28	7.17	7.23
	7.17	7.18	7.2	7.18
	7.23	7.14	7.1	7.15
	7.11	7.22	7.17	7.19
	7.1	7.1	7.1	7.1
	7.043	7.04	7.16	7.03
	6.98	6.88	6.91	6.92
	6.9	6.89	7.01	7.05
	7.053	7.017	7.04	7.013
	6.96	6.941	6.752	7.143
	6.78	6.75	6.66	6.68
	6.58	6.61	6.49	6.48
	6.42	6.38	6.28	6.24
<b>T2</b>	7.8	7.8	7.8	7.8
	7.33	7.38	7.41	7.41
	7.29	7.33	7.31	7.35
	7.2	7.25	7.25	7.22
	7.18	7.1	7.18	7.11
	7.223	7.025	7.276	7.13
	6.89	7.01	7.14	7.1
	7.05	7.07	7.042	6.89
	6.8	6.9	6.98	6.9
	6.87	6.988	6.54	6.99
	6.87	6.87	6.66	6.8
	6.818	6.699	6.933	6.8
	6.4	6.51	6.85	6.68
	6.564	6.56	6.71	6.7

	6.35	6.42	6.33	6.45
<b>T3</b>	7.8	7.8	7.8	7.8
	7.45	7.39	7.48	7.42
	7.38	7.33	7.32	7.32
	7.25	7.22	7.28	7.22
	7.14	7.25	7.16	7.18
	7.05	7.14	7.08	7.04
	7.01	7.15	7.15	7.01
	6.99	7.03	6.88	6.84
	6.917	6.81	6.839	6.78
	6.73	6.63	6.63	6.63
	6.64	6.89	6.71	6.7
	6.659	6.62	6.77	6.825
	6.49	6.53	6.61	6.74
	6.66	6.66	6.54	6.78
	6.76	6.55	6.68	6.79

**Anexo 4B. Datos de conductividad eléctrica (dS/m)**

	<b>R1 (dS/m)</b>	<b>R2 (dS/m)</b>	<b>R3 (dS/m)</b>	<b>R4 (dS/m)</b>
T0	6.35	6.35	6.35	6.35
	4.18	4.32	4.25	4.16
	3.74	4.15	4.148	4.074
	3.45	3.47	3.4	3.46
	3.04	3.1	3.04	3.1
	2.41	2.43	2.46	2.34
	2.07	1.8	2.13	2.04
	1.84	1.26	1.56	1.56
	1.04	1.05	1.01	1.16
	0.58	0.826	0.564	0.506
	0.352	0.222	0.276	0.303
	0.074	0.045	0.0081	0.0046
	0.0384	0.0282	0.0068	0.0241
	0.024	0.0089	0.0034	0.002
	0.0023	0.0046	0.0028	0.0021
T1	6.35	6.35	6.35	6.35
	4.26	4.36	4.86	4.36
	4.16	4.08	3.84	4.08
	3.68	3.64	3.46	3.64
	3.05	2.84	2.7	2.84
	2.51	2.26	2.1	2.26
	2.16	2.08	2.11	2.08
	1.08	1.56	1.66	1.56
	0.246	0.56	0.4	0.56
	0.094	0.091	0.088	0.091
	0.046	0.053	0.05	0.053
	0.025	0.019	0.001	0.019
	0.0046	0.0081	0.0077	0.0081
	0.0038	0.0064	0.006	0.0064
	0.0016	0.002	0.0012	0.002
T2	6.35	6.35	6.35	6.35
	4.35	4.88	4.2	4
	3.87	3.97	3.84	3.78
	3.15	3.25	3.55	3.49
	2.86	2.44	2.68	3
	2.16	1.8	2.42	2.16
	2.2	1.68	2	1.7
	1.67	1.66	2.1	1.07
	1.16	1.43	1.86	0.89
	1.01	0.6	1.46	0.77
	0.089	0.094	1.25	0.7
	0.027	0.088	0.94	0.35
	0.0082	0.05	0.089	0.3
	0.0065	0.048	0.046	0.19
	0.0014	0.0084	0.0044	0.009

T3	6.35	6.35	6.35	6.35
	4.58	4.16	4.8	4.1
	3.54	3.56	4.25	4.14
	3.04	3.6	3.74	3.54
	2.16	2.46	3.1	3.26
	2.08	1.56	2.3	2.5
	2	1.08	1.4	2.43
	1.35	0.56	1	1.85
	1.01	0.7	0.8	0.76
	1.1	0.084	0.09	0.081
	0.74	0.049	0.045	0.033
	0.22	0.019	0.018	0.019
	0.048	0.0093	0.0084	0.007
	0.0046	0.0076	0.0066	0.0071
	0.0016	0.007	0.0041	0.0068

#### Anexo 4C. Datos de humedad (%)

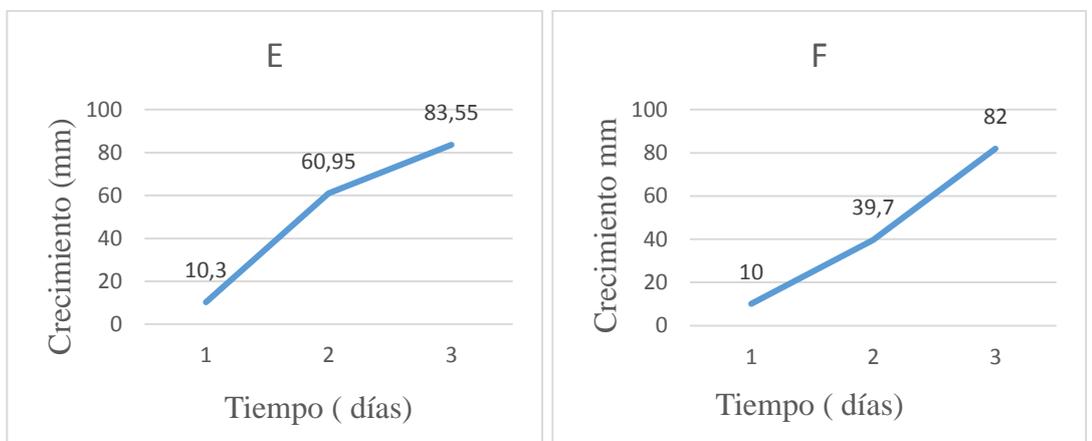
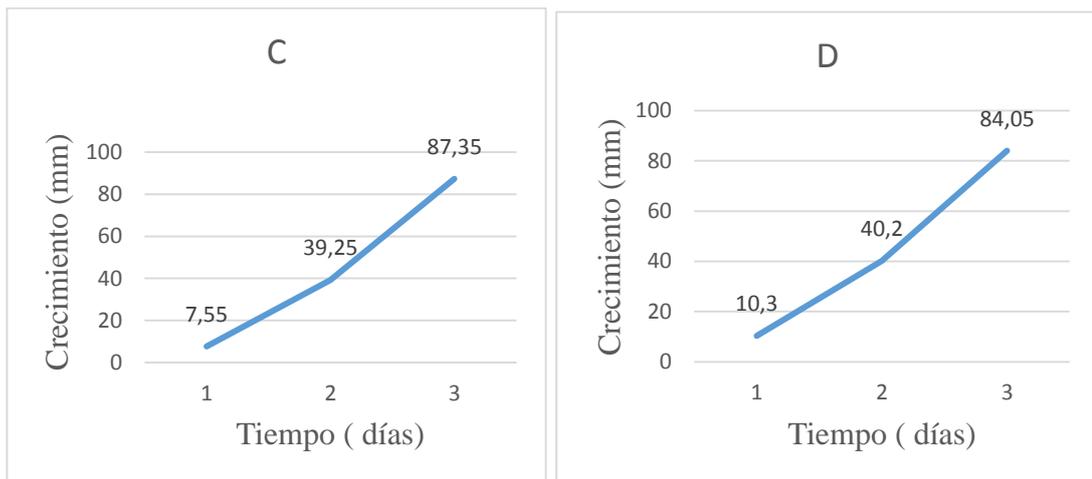
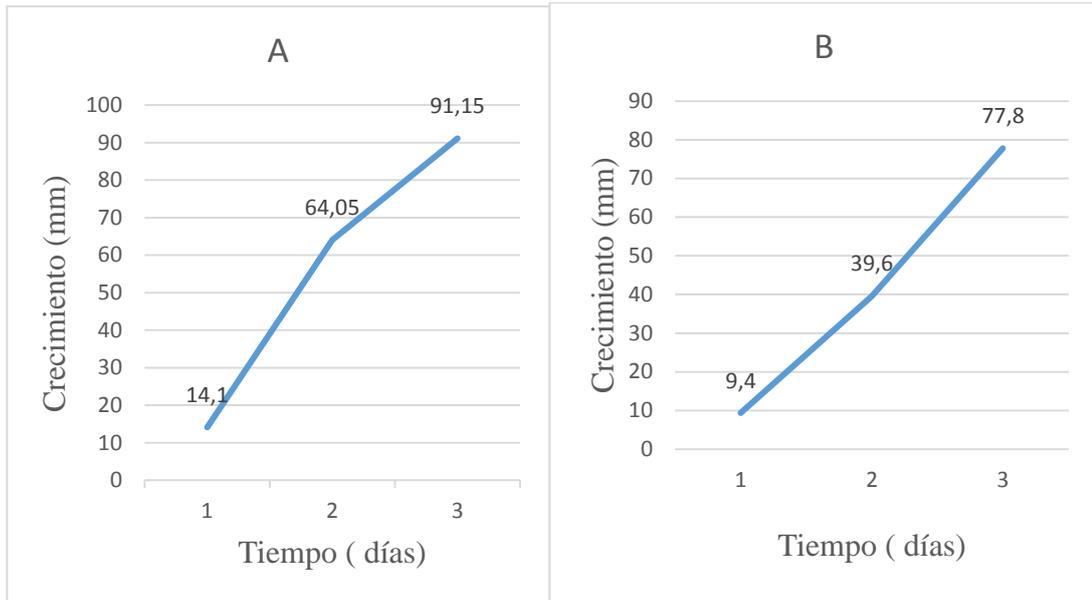
	<b>R1 (%)</b>	<b>R2 (%)</b>	<b>R3 (%)</b>	<b>R4 (%)</b>
<b>T0</b>	25.75	26.7	25.78	24.1
	24.81	25.84	25.12	24.18
	22.38	24.92	24.33	22.28
	20.89	25.15	24.15	22.07
	20.18	24.41	22.08	21.39
	20	23.15	24.05	20.15
<b>T1</b>	23.58	28.64	25.44	24.85
	23.8	28.5	22	26.78
	23	24.68	25.1	24.46
	22.58	27.30	22.70	23.74
	22.5	29.45	24.46	22.84
	22.15	26.45	22	24.23
	22.2	26.4	20.78	20.56
<b>T2</b>	29.56	29.48	25.1	25.6
	24.55	25.1	27.1	24.88
	20.15	22.9	22.34	23.5
	28.29	24.42	24.42	27.20
	27.33	23.25	26.56	28.08
	28	20.47	24.15	26.35
	28.44	24.88	21.2	28.41
<b>T3</b>	29.78	28.1	26.46	23.58
	27.64	24.56	26.56	24.45
	28.9	27.45	23.41	25.5
	29.76	25.60	28.00	23.10
	28.45	28.46	27.64	20.5
	26.45	29.78	20.16	21.68
	29.8	29	20	22.48

**Anexo 4D. Datos de temperatura ( °C)**

T0 ( °C)				T1( °C)				T2( °C)				T3( °C)			
R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
20	19	20	19	20	19	19	19	20	20	19	20	19	19	19	19
20	19	20	20	20	20	19	18	20	19	19	19	19	18	19	19
20	19	20	19	20	19	20	20	19	20	19	20	19	19	19	19
20	19	20	20	20	20	19	20	20	20	20	20	19	20	19	19
20	19	19	20	20	20	19	19	20	19	19	20	19	19	19	19
19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	18	18	18
18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	17	17	18	17
18	18	17	18	18	18	19	18	18	18	18	18	17	17	18	17
18	17	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	17	17	17	17
19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
19	19	19	19	19	19	19	19	19	18	19	19	18	18	18	18
20	20	20	20	20	20	19	20	20	19	20	20	19	19	19	19
20	20	20	20	20	20	19	20	20	19	20	20	19	19	19	19
20	20	20	19	20	20	20	20	20	18	20	19	19	19	20	19
19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	18	18	18	18
19	19	18	19	19	18	19	19	19	19	19	19	18	18	18	18
18	19	18	18	18	17	18	18	19	18	17	17	17	18	17	18
19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	18	19	18	18
19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	18	18	18	18
19	19	18	19	19	19	19	19	19	18	19	19	19	19	18	18
20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
20	20	20	20	20	20	20	20	20	19	20	20	19	20	20	20
20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19
19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	18	18	18	19	19
19	19	19	19	19	19	19	18	19	19	19	19	18	19	18	19
18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	17	18	18	17
18	19	19	19	19	19	19	19	18	19	19	19	19	18	18	18
19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	18	18	19	18
19	19	19	19	19	19	19	19	19	18	19	18	19	18	18	18
19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	18	18	18	18
19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
20	20	20	20	20	20	20	19	20	18	20	20	19	20	20	20
18	18	18	18	18	18	18	17	18	17	18	18	18	17	18	17
18	18	18	18	18	18	18	18	17	18	18	17	18	17	17	18
18	18	18	18	18	18	17	18	18	18	18	18	18	17	17	18
18	17	17	17	17	17	18	17	18	18	18	18	18	18	17	17
18	18	18	18	18	18	18	18	18	17	18	18	18	17	18	17
17	18	18	18	18	18	18	18	17	17	18	18	18	17	18	18
19	19	19	19	19	20	20	20	20	20	20	20	19	20	19	19
19	19	19	19	19	19	19	19	19	18	19	19	18	19	19	19
19	18	18	18	19	19	19	19	19	19	19	19	18	18	18	18
18	18	18	18	18	18	17	18	18	18	18	18	18	17	17	18

18	18	18	18	17	17	18	17	18	18	18	18	18	18	17	17
18	18	18	18	19	19	19	19	19	18	19	19	19	19	18	18
18	18	18	18	20	19	20	20	19	20	19	20	19	19	19	19
17	17	18	17	19	19	19	19	19	19	19	19	18	19	19	19
18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
18	18	17	18	19	19	19	19	19	18	19	19	18	19	19	19
18	18	18	18	19	19	19	19	19	19	19	19	18	18	18	18
18	18	18	18	19	19	19	19	19	19	18	19	19	18	19	19
19	19	19	19	19	20	19	19	19	19	19	19	20	19	19	19
19	19	19	19	20	20	20	20	19	19	19	19	19	19	19	19
19	20	19	19	19	20	19	19	19	20	19	19	19	19	19	19
18	18	19	18	18	18	18	19	18	19	19	19	18	19	18	19
18	18	18	19	19	19	18	18	18	18	19	19	19	19	19	19
19	19	20	19	20	20	19	19	19	19	19	19	20	19	19	19
20	20	19	19	19	20	19	19	20	19	20	19	19	20	20	19
19	20	20	20	19	19	19	19	19	20	19	19	20	19	19	19
19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	20	19	19	19	19
18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	19	19	18	19	18	19
18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	19	19	18	19	19	19
19	18	19	18	19	18	19	18	19	18	19	19	18	19	19	19
19	18	18	19	19	19	18	18	18	19	19	19	19	19	19	19
19	18	18	18	18	19	19	18	18	18	19	19	18	19	19	18
17	17	18	18	18	18	17	18	18	17	17	17	18	18	18	18
18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	19	19	18	19	18	19
18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	19	19	18	19	19	19

**Anexo 4E. Datos de la cinética de *Trichoderma***



**Anexo 4F. Datos del conteo de colonias de *Pseudomonas***

		<b>Repetición 1</b>				<b>A</b>	<b>Repetición 2</b>			
		<b>Número de colonias</b>					<b>Número de colonias</b>			
		<b>Tiempo ( horas)</b>			<b>Total UFC/mL</b>	<b>Tiempo ( horas)</b>			<b>Total UFC/mL</b>	
		<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>		<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>		
<b>Dilución</b>	<b>10<sup>1</sup></b>	36	85	226	2260	38	154	-	Incontable	
	<b>10<sup>2</sup></b>	20	65	123	12300	16	39	68	6800	
	<b>10<sup>3</sup></b>	12	14	17	17000	11	18	23	23000	

		<b>Repetición 1</b>				<b>B</b>	<b>Repetición 2</b>			
		<b>Número de colonias</b>					<b>Número de colonias</b>			
		<b>Tiempo ( horas)</b>			<b>Total UFC/mL</b>	<b>Tiempo ( horas)</b>			<b>Total UFC/mL</b>	
		<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>		<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>		
<b>Dilución</b>	<b>10<sup>1</sup></b>	68	180	-	Incontable	62	150	226	2260	
	<b>10<sup>2</sup></b>	35	68	130	13000	28	64	81	8100	
	<b>10<sup>3</sup></b>	8	16	22	22000	13	19	22	22000	

		<b>Repetición 1</b>				<b>C</b>	<b>Repetición 2</b>			
		<b>Número de colonias</b>					<b>Número de colonias</b>			
		<b>Tiempo ( horas)</b>			<b>Total UFC/mL</b>	<b>Tiempo ( horas)</b>			<b>Total UFC/mL</b>	
		<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>		<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>		
<b>Dilución</b>	<b>10<sup>1</sup></b>	55	144	-	Incontable	41	101	170	1700	
	<b>10<sup>2</sup></b>	41	76	121	12100	28	67	83	8300	
	<b>10<sup>3</sup></b>	7	16	19	19000	11	15	19	19000	

		<b>Repetición 1</b>				<b>D</b>	<b>Repetición 2</b>			
		<b>Número de colonias</b>					<b>Número de colonias</b>			
		<b>Tiempo ( horas)</b>			<b>Total UFC/mL</b>	<b>Tiempo ( horas)</b>			<b>Total UFC/mL</b>	
		<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>		<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>		
<b>Dilución</b>	<b>10<sup>1</sup></b>	56	102	176	1760	38	86	166	1660	
	<b>10<sup>2</sup></b>	35	66	87	8700	17	35	66	6600	
	<b>10<sup>3</sup></b>	15	28	36	36000	8	18	28	28000	

