UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

Trabajo de titulación previo
a la obtención del título de
Ingeniera Ambiental

TRABAJO EXPERIMENTAL:

"BIORREMEDIACIÓN DE HAPs EN MICROCOSMOS DE SUELO MEDIANTE BIOESTIMULACIÓN CON NITRÓGENO A NIVEL DE LABORATORIO"

AUTORAS:

JAZMIN PILAR SALINAS ALVAN

ROSALIA SARMIENTO SARMIENTO

TUTOR:

MANUEL ERNESTO DELGADO FERNÁNDEZ, PhD.

CUENCA - ECUADOR

2020

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Nosotras, Jazmin Pilar Salinas Alvan con documento de identificación Nº 1105819898 y Rosalia Sarmiento Sarmiento con documento de identificación Nº 0302893995, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales, en virtud de que somos autoras del trabajo de titulación: **"BIORREMEDIACIÓN DE HAPs EN MICROCOSMOS DE SUELO MEDIANTE BIOESTIMULACIÓN CON NITRÓGENO A NIVEL DE LABORATORIO"**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de*: Ingeniera Ambiental* en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En la aplicación a lo determinado por la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autoras nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca a la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, noviembre del 2020

Jazmin Pilar Salinas Alvan
C.I.1105819898

Rosalia Sarmiento Sarmiento
C.I. 0302893995

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **"BIORREMEDIACIÓN DE HAPs EN MICROCOSMOS DE SUELO MEDIANTE BIOESTIMULACIÓN CON NITRÓGENO A NIVEL DE LABORATORIO"**, realizado por Jazmin Pilar Salinas Alvan y Rosalia Sarmiento Sarmiento obteniendo el *Trabajo Experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, noviembre del 2020

Manuel Ernesto Delgado Fernández, PhD.
C.I. 0102073780

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Nosotras, Jazmin Pilar Salinas Alvan con documento de identificación N° 1105819898 y Rosalia Sarmiento Sarmiento con documento de identificación N° 030893995, autoras del trabajo de titulación: "**BIORREMEDIACIÓN DE HAPs EN MICROCOSMOS DE SUELO MEDIANTE BIOESTIMULACIÓN CON NITRÓGENO A NIVEL DE LABORATORIO",** certificamos que el total contenido del *Trabajo Experimental* es de nuestra responsabilidad y autoría.

Cuenca, noviembre del 2020

Jazmin Pilar Salinas Alvan
C.I.1105819898

Rosalia Sarmiento Sarmiento
C.I. 0302893995

Dedicatoria

Con todo amor y cariño dedico este proyecto a mis padres Ángel y Marcia por ser el pilar fundamental en mi vida, ya que con su esfuerzo y sacrificio me pudieron dar una profesión, además de brindarme todo su apoyo incondicional y motivarme siempre a salir adelante.

A mis abuelitos quienes siempre estuvieron ahí motivándome con una palabra de aliento, por todo el apoyo que siempre me brindaron en cada año de la carrera universitaria y por haber sido parte de este gran logro.

A mi familia en general por haber depositado toda su confianza en mí, por siempre estar ahí en los momentos más difíciles y por haberme motivado a salir adelante y no decaer.

Jazmin Salinas.

Dedicatoria

El presente trabajo se lo dedico principalmente a Dios por brindarme la fortaleza, sabiduría y firmeza para seguir adelante y cumplir una meta más en mi vida.

A mis padres José y Gloria por haber sido mis principales maestros, me brindan su amor, comprensión y apoyo incondicional en todos estos años, gracias a su sacrificio y esfuerzo he podido llegar hasta aquí. Gracias por estar conmigo en cada momento.

A mis hermanos Jhony, Braulio, Wilma, Marlene, Jessica y José por su apoyo y amor incondicional, quienes me apoyaron para continuar mis estudios y siempre estar presente.

A mi amiga y compañera de tesis Jazmin, por haberme brindado su confianza y su apoyo, por el gran trabajo en equipo hemos podido llegar a cumplir una meta más en nuestras vidas.

A todos mis familiares y amistades que me apoyaron y han hecho que este trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que me abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

Rosalia Sarmiento.

Agradecimientos

Un agradecimiento especial al Dr. Ernesto Delgado, tutor de este trabajo de investigación, por su apoyo incondicional en base a su conocimiento sobre el tema, gracias por todo.

Agradecemos al Dr. Fernando Antonio Morales de la Unidad de Gestión Ambiental de la Universidad Simón Bolívar por su invaluable apoyo y asesoría prestada en todo el desarrollo de nuestro trabajo de investigación.

Nuestro profundo agradecimiento a la Dra. Inés Malo por siempre brindarnos su ayuda en la etapa de laboratorio.

Nuestro agradecimiento a la empresa ELECAUSTRO S.A. por el apoyo brindado para el desarrollo de nuestra investigación.

Agradecemos a la Universidad Politécnica Salesiana por permitirnos realizar nuestra investigación en sus laboratorios de manera especial a la Dra. Mónica Espadero.

Agradecemos a nuestros familiares por ser los pilares fundamentales en todo el proceso de formación académico, así mismo por brindarnos su apoyo y motivación para seguir adelante.

Agrademos también a todos nuestros amigos de manera especial Amon, Carlos y Geovanni, por compartir su amistad en todos estos años de vida universitaria en los momentos buenos y en los de bajón, por siempre arrancarnos una sonrisa con su entusiasmo y darnos ánimo en todo momento.

Jazmin Salinas y Rosalia Sarmiento.

Resumen

En el presente estudio se evaluó el efecto del nitrógeno (N_2) como bioestimulante de un proceso de biorremediación a nivel de laboratorio. Para el efecto se preparó microcosmos de suelo contaminado con búnker proveniente de la Central Termoeléctrica "El Descanso". Para la valoración se consideró las siguientes variables: capacidad de campo, pH, temperatura y relación C/N; se evaluaron 6 tratamientos durante un período de 90 días, atenuación natural (T1), bioestimulación con materia orgánica vegetal (T2), materia orgánica vegetal y bioestimulación con urea relación C/N de 60:1 (T3), materia orgánica vegetal y bioestimulación con urea relación C/N de 100:10 (T4), bioestimulación con urea relación C/N de 60:1 (T5) y bioestimulación con urea relación C/N de 100:10 (T6).

De acuerdo a los resultados el mayor porcentaje de degradación de HAPs con un 99,27% se dio con el T6 demostrando que la bioestimulación con urea beneficia el proceso de degradación de hidrocarburos aromáticos.

Luego del proceso se valoró la toxicidad del suelo a través de bioensayos con semillas, para el caso con *Lactuca sativa*; los bioensayos se sometieron a un tiempo de exposición de 120 horas. Los resultados del protocolo evidencian que en todos los tratamientos no se presentó inhibición en la germinación de las semillas ni afectación en el desarrollo del hipocótilo, sin embargo, los tratamientos T3 y T4 evidenciaron inhibición en el desarrollo de la radícula.

Palabras claves: Biorremediación, Hidrocarburos aromáticos policíclicos, Nitrógeno, Bioestimulación, Bioensayo.

Abstract

In the present study, the effect of nitrogen (N2) as a biostimulant in a laboratory bioremediation process was evaluated. For this purpose, microcosm of soil contaminated with bunker from the "El Descanso" Thermoelectric Power Plant was prepared. For the assessment, the following variables were considered: field capacity, pH, temperature and C/N ratio; 6 treatments were evaluated during a period of 90 days, natural attenuation (T1), biostimulation with plant organic matter (T2), plant organic matter and biostimulation with urea C / N ratio of 60: 1 (T3), plant organic matter and biostimulation with urea C / N ratio of 100: 10 (T4), biostimulation with urea C / N ratio of 60: 1 (T5) and biostimulation with urea C / N ratio of 100: 10 (T6).

According to the results, the highest percentage of degradation of PAHs with 99.27% occurred with T6, showing that biostimulation with urea benefits the degradation process of aromatic hydrocarbons.

After the process, the toxicity of the soil was evaluated through bioassays with seeds, for the case with Lactuca sativa; the bioassays were subjected to an exposure time of 120 hours. The results of the protocol show that in all the treatments there was no inhibition in the germination of the seeds or affectation in the development of the hypocotyl, however, the treatments T3 and T4 showed inhibition in the development of the radicle.

Keywords: Bioremediation, Polycyclic aromatic hydrocarbons, Nitrogen, Biostimulation, Bioassay.

ÍNDICE GENERAL

CAPITULO 1.- 1

1.1 Introducción 1

1.2 Justificación 2

1.3 Objetivos 3

1.3.1 Objetivo General 3

1.3.2 Objetivos Específicos 3

1.4 Marco Teórico 3

1.4.1 Petróleo 3

1.4.2 Composición del petróleo 4

1.4.3 Derivados de petróleo 5

1.4.4 Hidrocarburos aromáticos policíclicos 7

1.4.4.1 Formación de los HAPs 10

1.4.4.2 El riesgo de los HAPs en el medio ambiente 10

1.4.5 ¿Qué es el suelo? 11

1.4.5.1 Formación del suelo 11

1.4.6 Contaminación del suelo por hidrocarburos 12

1.4.7 Método biológico de remediación de suelos 13

1.4.7.1 Biorremediación ambiental 13

1.4.7.2 Factores que influyen en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos 14

1.4.7.2.1 Temperatura 14

1.4.7.2.2 Humedad 14

1.4.7.2.3 Población microbiana 15

1.4.7.2.4 Disponibilidad de nutrientes 15

1.4.7.2.5 pH del suelo 15

1.4.7.2.6 Disponibilidad de oxígeno en el suelo 16

1.4.8 Técnicas de biorremediación 16

1.4.8.1 Biorremediación *ex-situ* 17

1.4.8.1.1 Estrategias de biorremediación *ex-situ* 18

1.4.8.2 Biorremediación *in-situ* 19

1.4.8.2.1 Estrategias de biorremediación *in-situ* 19

1.4.9 Evaluación de toxicidad del suelo 22
1.4.9.1 Bioensayo con semillas 22
1.4.9 Legislación Ecuatoriana y límites permisibles 23
CAPITULO 2.- 25
MATERIALES Y MÉTODOS 25
2.1 Análisis fisicoquímico del suelo 25
2.2 Diseño experimental 26
2.2.1 Preparación de los microcosmos 26
2.2.2 Unidades experimentales 28
2.2.3 Condiciones del ensayo 28
2.2.4 Método de extracción y purificación de muestras de suelo contaminado 29
2.2.5 Método analítico para determinar la concentración de HAPs 30
2.2.6 Evaluación de la toxicidad del suelo luego del proceso de biorremediación 31
2.3 Análisis estadístico 33
CAPÍTULO 3.- 34
RESULTADOS 34
3.1 Análisis fisicoquímico del suelo 34
3.2 Concentración de HAPs 34
3.3 Análisis estadístico 35
Punto 1 37
Punto 2 40
Punto 3 42
Punto 4 44
3.4 Valoración de la toxicidad del suelo 48
3.4.1 Bioensayo con semillas de Lechuga (*Lactuca sativa)* 48
3.4.2 Índice de germinación de las semillas de lechuga (*Lactuca sativa)* 49
3.4.3 Desarrollo del hipocótilo de las semillas de *Lactuca sativa* 50
3.4.4 Desarrollo de la radícula de las semillas de *Lactuca sativa* 51
DISCUSIÓN 54
CONCLUSIONES 56
BIBLIOGRAFÍA 58
ANEXOS 66

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nombre y estructura de los HAPs según la US-EPA. 8
Tabla 2. Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en toda la fase de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicio. 23
Tabla 3. Criterios de remediación o restauración (Valores máximos de concentración de contaminantes de un suelo). 24
Tabla 4. Metodologías para el análisis fisicoquímico. 26
Tabla 5. Condiciones de los microcosmos de suelo para la biorremediación. 28
Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas del suelo. 34
Tabla 7. Períodos de muestreo para la valoración de biodegradación de HAPs. 34
Tabla 8. Resultados del análisis inicial de HAPs por CG-MS del testigo referencial. 35
Tabla 9. Concentraciones de HAPs luego de 15 días. 37
Tabla 10. Resultados del ANOVA a los 15 días de experimentación. 38
Tabla 11. Prueba de Tukey con un nivel de confianza de 95%. 38
Tabla 12. Concentración de HAPs a los 30 días. 40
Tabla 13. Resultado ANOVA luego de los 30 días de experimentación. 41
Tabla 14. Análisis de Tukey con un nivel de confianza del 95%. 41
Tabla 15. Concentración de HAPs a los 60 días. 42
Tabla 16. Resultado ANOVA luego de los 60 días de experimentación. 43
Tabla 17. Prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%. 43
Tabla 18. Concentración de HAPs transcurrido los 90 días de experimentación. 45
Tabla 19. Resultado ANOVA de los 90 días de experimentación. 45
Tabla 20. Prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%. 46
Tabla 21. Porcentaje de germinación de las semillas de Lactuca sativa. 49
Tabla 22. Índices de germinación de cada tratamiento. 49
Tabla 23. Longitud del hipocótilo de las semillas de Lactuca sativa. 50
Tabla 24. Resultados ANOVA de la longitud del hipocótilo. 50
Tabla 25. Longitud de la radícula de las semillas de lechuga. 51
Tabla 26. Resultados ANOVA sobre la longitud de la radícula de las semillas. 52
Tabla 27.Prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%. 52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrategias de biorremediación in situ y ex situ 17
Figura 2. Toma de muestras de búnker 25
Figura 3. Esquema de la preparación de microcosmos 26
Figura 4. Preparación de microcosmos 27
Figura 5. Microcosmos de suelo contaminado con búnker 27
Figura 6. Tratamientos aplicados 28
Figura 7. Diagrama del proceso de extracción y depuración del suelo 30
Figura 8. Morfología de una plántula de *Lactuca sativa* (lechuga) germinada 31
Figura 9. Distribución de las semillas de *Lactuca sativa* en las cajas Petri 32
Figura 10. Cromatograma CG-MS de la muestra en el testigo referencial 37
Figura 11. Diagrama de cajas de la concentración de HAPs a los 15 días. 39
Figura 12. Diagrama de caja de las concentraciones de HAPs a los 30 días 42
Figura 13. Diagrama de cajas de las concentraciones de HAPs a los 60 días 44
Figura 14. Diagrama de caja de las concentraciones de HAPs a los 90 días 47
Figura 15. Variación de la concentración de HAPs durante el proceso de biorremediación 48
Figura 16. Plántulas de lechuga (a) Semillas de lechuga germinadas, (b)medición de las plántulas 48
Figura 17. Comparación de elongación de la longitud del hipocótilo de las semillas 51
Figura 18. Comparación de elongación de la longitud de la radícula de las semillas 53

CAPITULO 1.-

1.1 Introducción

La industria petrolera a nivel global se considera un componente significativo en la economía, sin embargo, el petróleo al ser una mezcla compleja de varios elementos principalmente hidrocarburos que conforman el 75% de su composición (Li et al., 2018; Varjani & Upasani, 2017), y un recurso natural no renovable provoca impactos en el ambiente y en la sociedad. En el Ecuador la explotación de petróleo tiene una extensa historia de conflictos sociales y ambientales debido a la inevitable liberación de sustancias peligrosas en los procesos de extracción, refinación y transporte de petróleo (Arellano, Tansey, Balzter, & Boyd, 2015; Correa, De Souza, & De Oliveira, 2019).

Por este motivo, la contaminación por hidrocarburos se ha convertido en un problema de gran preocupación a nivel mundial (Anejionu, Ahiarammunnah, & Nri-ezedi, 2015; Varjani & Upasani, 2019); los hidrocarburos producen alteraciones en la estructura del suelo como la retención de agua en la capa superficial (hidrofobicidad), agotamiento de la vida silvestre y especies acuáticas (Anejionu, Ahiarammunnah, & Nri-ezedi, 2015; Ortínez, Lema, & Gavilán, 2003).

Para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos se han desarrollado diversas técnicas de remediación, entre las cuales está la biorremediación (Bento, Camargo, Okeke, & Frabkenberger, 2005; Infante et al., 2010; Quintella, Mata, & Lima, 2019). Esta tecnología se ha venido desarrollando a lo largo de los años, por ser un método de bajo costo, sencillo y ambientalmente amigable con el entorno en comparación con los demás métodos fisicoquímicos (Pino, Carvajal, Gallo, & Peñuela, 2012).

En este sentido, la bioestimulación es una de las estrategias de biorremediación utilizada en la remediación de sitios contaminados con hidrocarburos, estimulando a los microorganismos

presentes en un ambiente natural a través del suministro de nutrientes que mejoran el proceso de mineralización del contaminante (García, Roldán, & Garzón, 2011).

En el presente estudio, buscamos analizar la influencia del nitrógeno en la biorremediación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en microcosmos de suelo a nivel de laboratorio, optimizando el proceso a través del control de condiciones ambientales y una relación C/N óptima.

1.2 Justificación

Al ser nuestro país productor de petróleo (Buendía, 2012; Cando, 2011), es preciso prestar atención a los impactos ambientales que genera la contaminación por Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs). La contaminacion por hidrocarburos produce alteraciones en la capacidad natural para conservar una extensa variedad de organismos, reduce la fertilidad, limita las actividades productivas y genera efectos nocivos potenciales en los ecosistemas y en la salud humana (Buendía, 2012; Jiménez, Medina, & Gracida, 2010).

Para depurar matrices con hidrocarburos se utilizan diferentes tecnologías, estas se basan en métodos físicos, químicos y biológicos. Es así, que se consideró como método biológico a la bioestimulación, técnica que se basa en mantener y estimular la carga micróbica nativa para acelerar el proceso de mineralización de los compuestos orgánicos.

Debido a la elevada concentración de carbono en el búnker se produce un desbalance en la relación carbono nitrógeno y como consecuencia la inhibición del crecimiento de ciertos microorganismos (Infante et al., 2010; Vallejo, Sandoval, Garagoa, & Bastos, 2016). De ahí, la importancia de mantener una adecuada relación C/N para que los microorganismos sean capaces de tolerar cierto tipo de hidrocarburos y puedan utilizar el carbono para su desarrollo (Wu, Wu, Zhang, & Ye, 2019).

En el presente estudio se utilizó nitrógeno (N_2) como recurso para incrementar el metabolismo microbiano indispensable para la producción de aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos fundamentales para mantener una marcada actividad metabólica (Acuña, Pucci, & Pucci, 2008; Dias et al., 2012; Wu et al., 2019).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Analizar el efecto de la concentración de nitrógeno en un proceso de biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) a nivel de microcosmos de suelo.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Diseñar y preparar microcosmos de suelo contaminado con el corte de petróleo conocido como "búnker oíl".
- Valorar el proceso de biorremediación de los HAPs en función del tiempo de tratamiento mediante análisis de suelo en los microcosmos.
- Evaluar la toxicidad del suelo a través de ensayos con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) luego del proceso de biorremediación.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Petróleo

La palabra petróleo proviene de dos voces latinas *petra* (roca) y *óleum* (aceite), es decir, aceite de roca (Walters, 2017). Se conoce al petróleo como una mezcla natural de compuestos hidrocarburíferos líquidos, sólidos y gaseosos que son producidos en depósitos de rocas sedimentarias y están formados por pequeñas cantidades de nitrógeno, oxígeno, azufre, y cantidades mínimas de constituyentes metálicos (Speight & Shafik, 2018). La composición del

petróleo viene influenciada por: el tipo de organismos que aportaron con materia orgánica, el lugar de acumulación y la exposición térmica (Walters, 2017).

1.4.2 Composición del petróleo

El petróleo, es una mezcla de una gran variedad de sustancias orgánicas, principalmente de hidrocarburos, compuestos que están formados esencialmente por carbono (80-87%) e hidrógeno (10-15%) siendo los elementos más abundantes, de igual forma existe la presencia de oxígeno (0-5%), azufre (0-10%) y nitrógeno (0-1%) en menores cantidades (Agraz, 2015). Los hidrocarburos de petróleo se clasifican en cuatro fracciones simples: saturados, aromáticos, resina y asfaltenos (Li et al., 2018; Varjani & Upasani, 2017).

- Fracción de saturados: Corresponde a la suma de los hidrocarburos parafínicos (formados por cadenas abiertas de hidrocarburos) y cicloparafínicos (formados por cadenas cerradas de hidrocarburos).
- Fracción de aromáticos: Está formada por compuestos que poseen uno o más anillos bencénicos en su estructura.
- Fracción de resinas: son compuestos sólidos amorfos disueltos que contienen nitrógeno, azufre y oxígeno.
- Fracción de asfaltenos: Son moléculas polares coloidales de gran tamaño, siendo más resistentes a la biodegradación (Ponce, 2014).

De manera general, los hidrocarburos de petróleo poseen una fracción degradable entre el 70 y 97%, que comprende a los hidrocarburos saturados y aromáticos, y el resto lo constituye los asfaltenos y las resinas siendo en su mayoría inertes (Prince, Varadara, Fiocco, & Lessard, 1999).

Cada fracción, posee compuestos con sus propias características de solubilidad, volatilidad y toxicidad; cabe señalar que la clasificación de los hidrocarburos puede darse de acuerdo a su biodegradabilidad (Braibant, 2004).

1.4.3 Derivados de petróleo

Los derivados del petróleo potenciales son los combustibles los cuales están compuestos por cientos de hidrocarburos no polares que se diferencian según su masa molecular y su estructura química (Groysman, 2014).

Algunos derivados de petróleo más representativos son:

- **La Gasolina**

Mezcla compleja de varios compuestos orgánicos de diversas estructuras, propiedades y pesos moleculares, el rango de números de carbonos varia de 4 a 12, el número de carbono más frecuente es el 8 (Yu et al., 2019). La gasolina está compuesta por parafinas (30%), aromáticos (35%), olefinas (18-25%) y naftenos (5%) (Groysman, 2014).

- **Gas Licuado de petróleo (GLP)**

Es obtenido en la etapa de extracción de petróleo y gas natural, este derivado es una mezcla de propano siendo un hidrocarburo saturado, butano es un gas altamente inflamable y otras sustancias en pequeñas cantidades. El GLP en su forma gaseosa es más pesado que el aire y en su forma líquida más liviano que el agua, este producto no es tóxico para la salud humana (Synák, Čulík, Rievaj, & Gaňa, 2019).

- **Diésel**

Es una mezcla compleja de hidrocarburos con un índice de carbono que varía entre 8 a 26 átomos. Sus componentes principales son los alcanos, tanto de cadena lineal como ramificados y aromáticos (Adam & Duncan, 2000). Además, está conformado por parafinas y cicloparafinas (Fauzul, Budi, & Slistiyaning, 2019).

- **Queroseno**

La palabra queroseno deriva del término griego "keros" que significa cera. Este derivado es una mezcla líquida de sustancias químicas generadas en el proceso de destilación del petróleo crudo (Maheshwari & Gulati, 2018). Su composición química depende del origen, generalmente consta de decenas de hidrocarburos diferentes, donde cada molécula contiene de 9 a 16 átomos de carbono. El queroseno está conformado por parafinas (45%), naftenos (35%) y aromáticos (20%), también puede contener olefinas, sustancias químicas que contienen azufre y oxígeno (Groysman, 2014).

- **Nafta**

Es considerada como la fracción destilada más ligera y volátil de los hidrocarburos líquidos contenidos en el petróleo crudo. Este producto está compuesto por parafinas (65-85%), naftenos (30%) y aromáticos (5%) (Groysman, 2014).

- **Búnker o Fuel oíl**

Se conoce como búnker a diversos productos de petróleo líquido que se incineran en una caldera u horno para producir calor o son usados en un motor para producir energía eléctrica (Lee, Kim, & Kim, 2011). Se produce a partir de la destilación de petróleo luego de la eliminación de productos como queroseno, diésel y nafta (Alizadeh & Nomikos, 2009). Contiene largas cadenas de hidrocarburos principalmente alcanos, cicloalcanos y aromáticos (Groysman, 2014).

El búnker se clasifica en 6 clases ordenadas del 1 al 6 de acuerdo a su punto de ebullición, composición y propósito; el punto de ebullición y la longitud del enlace de carbono del combustible se incrementa en función del número de grado (Lee et al., 2011).

El fuel oil es poco soluble en agua por ello puede movilizarse por separado durante el flujo de agua por medio de la matriz del suelo o llegar a disolverse parcialmente en el agua subterránea. Además, presenta una elevada toxicidad amenazando el suelo, el agua subterránea y a los seres humanos (Miles, Maji, Sudicky, Teutsch, & Peter, 2008).

1.4.4 Hidrocarburos aromáticos policíclicos

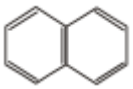
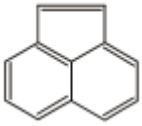
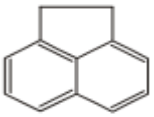
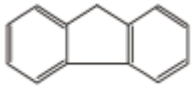
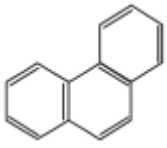
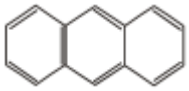
Son compuestos orgánicos que están constituidos por anillos de benceno fundido conformados por carbono e hidrógeno formando ciclos aromáticos con 2 o más anillos condensados (Nzila, 2018). La velocidad de degradación y clasificación de los HAPs, viene dada por el número de anillos aromáticos de benceno, donde los HAPs de bajo peso molecular (LMW) están representados por dos o tres anillos de benceno, y los HAPs de alto peso molecular (HMW) están conformados por más de tres anillos de benceno, los últimos presentan una baja biodisponibilidad y son menos susceptibles a la degradación microbiana (Sakshi, Singh, & Haritash, 2019).

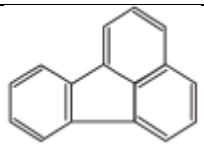
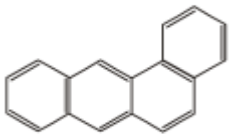
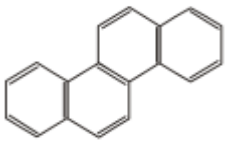
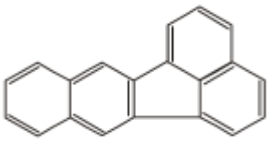
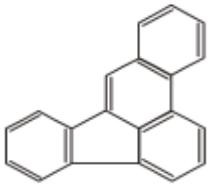
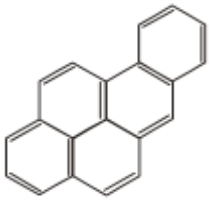
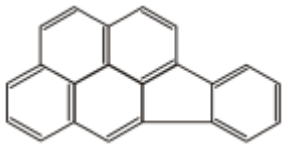
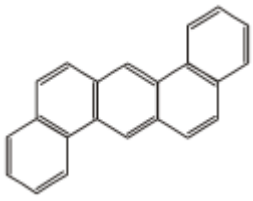
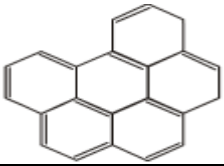
El comportamiento ambiental de los HAPs viene determinado por su peso molecular, su configuración estructural y el número de anillos; los HAPs de bajo peso molecular son más fácilmente degradables debido a su naturaleza semivolátil y mayor solubilidad, por su parte los HAPs de alto peso molecular presentan una baja biodisponibilidad y son menos susceptibles a la degradación microbiana (Izquierdo, 2013).

Los HAPs cuentan con propiedades tóxicas, en su mayoría son persistentes en el ambiente, debido a su estabilidad estructural, hidrofobicidad y baja solubilidad en agua (Torri, Cabrera, & Alberti, 2018).

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), reconoce la existencia de más de 100 HAPs debido a la fusión de un número variable de anillos y las diferentes ubicaciones en las que sus anillos pueden unirse (Seminoti, Menezes, Antoniolli, & De Oliveira, 2007), sin embargo, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) reconoce dieciséis HAPs básicos en la lista de contaminantes prioritarios, debido a su alta estabilidad, extensa distribución en el ambiente y a sus propiedades teratogénicas, mutagénicas y carcinogénicas (Qianjun Liu et al., 2019; Varjani & Upasani, 2017) (Tabla 1).

Tabla 1. Nombre y estructura de los HAPs según la US-EPA.

Nombre común	Peso molecular	Número de anillos	Estructura molecular
Naftaleno	128	2	
Acenaftileno	152	3	
Acenafteno	154	3	
Fluoreno	166	3	
Fenantreno	178	3	
Antraceno	178	3	

Fluoranteno	202	4	
Pireno	202	4	
Benzo(a)antraceno	228	4	
Criseno	228	4	
Benzo(k)fluoranteno	5	5	
Benzo(b)fluoranteno	252	5	
Benzo(a)pireno	252	5	
Indeno(1,2,3-cd)pireno	276	6	
Dibenzo(a,h)antraceno	278	6	
Benzo(g,h,i)perileno	276	6	

Fuente: (Kastner, 2008; Seminoti et al., 2007)

1.4.4.1 Formación de los HAPs

Los HAPs son compuestos que se generan por pirólisis o combustión incompleta de biomasa y combustibles fósiles, a una temperatura elevada la pirólisis de compuestos orgánicos genera fragmentos de moléculas y radicales que se mezclan para dar origen a los HAPs, esto puede ocurrir de forma natural o antrópica (H. Chen et al., 2019).

Las fuentes naturales para la generación de HAPs son los incendios forestales y pastizales, yacimientos de petróleo o erupciones volcánicas. Sin embargo, las fuentes antrópicas son las que más contribuyen a su formación, como la quema de combustibles fósiles con fines energéticos, en el tratamiento de la madera con creosota, mediante el uso de lubricantes, en el refinamiento de petróleo y actividades de transporte (Petruzzelli, Pedron, Rosellini, Grifoni, & Barbafieri, 2016).

1.4.4.2 El riesgo de los HAPs en el medio ambiente

Según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) los HAPs son un grupo de hidrocarburos contaminantes de control prioritario, ya que son cancerígenos, teratogénicos, y por su capacidad de bioacumularse (Meng et al., 2019).

Los HAPs pueden llegar a dispersarse en el aire, suelo y agua, siendo la fuente principal de HAPs en el aire la combustión incompleta de biomasa, combustibles fósiles y el tráfico vehicular. La fuente de contaminación del suelo más común es la deposición atmosférica, en donde se espera que gran parte de los HAPs derivados de la combustión se alojen en la capa superior del suelo (Yu et al., 2013), la contaminación del agua con HAPs se produce por descargas de combustibles y derrames de petróleo (Meng et al., 2019). Siendo la contaminación del suelo la que genera mayor afectación al ser humano en comparación con la contaminación del aire y agua (Yu et al., 2013).

Por todo lo mencionado, la contaminación por hidrocarburos se ha convertido en una de las preocupaciones mundiales más graves debido al efecto tóxico que genera problemas a los microorganismos y todas las formas vida, incluido a los seres humanos (Varjani & Upasani, 2017).

1.4.5 ¿Qué es el suelo?

Según el TULSMA (2014) lo define como un medio poroso formado en la superficie terrestre a través de procesos de meteorización por largos períodos, se vinculan fenómenos biológicos, hidrológicos y geológicos.

Este recurso natural es parte esencial de los ecosistemas terrestres (Milena & Correa, 2009), cumple funciones ambientales importantes como sustento de alimento para plantas, fuente de nutrientes, depósito de la biodiversidad floral y faunística, almacenamiento de materia orgánica proveniente de restos animales y vegetales, la purificación de los suministros de agua y medio protector del ambiente (Wilson, 2019).

1.4.5.1 Formación del suelo

Se detallan a continuación los principales factores:

- **Material Parental.** Es el estado inicial del suelo, este factor brindan las principales materias primas para la formación del suelo y provee un entorno nutricional básico para el desarrollo de la comunidad microbiana (Osman, 2013). Algunas propiedades del perfil del suelo como el horizonte de diagnóstico genético, la configuración textural y estructural, el pH, la mineralogía, el color y la micromorfología también son proporcionadas por el material parental (Yassoglou, Tsadilas, & Kosmas, 2017) .
- **El clima.** Interviene directamente en el suelo por medio de la precipitación y la temperatura, además es un factor determinante para la vegetación; el clima es también un

agente primordial en la alteración química del suelo y de la desintegración mecánica de diversos sustratos (O´Sullivan, Mcconnell, Scanlon, Walsh, & Creamer, 2018).

- **Topografía.** Es un factor que interviene en la distribución del suelo y sus propiedades, controla el flujo de agua y el transporte de materiales, además cambia el clima local, la composición de la vegetación y otras condiciones (X. Li, Chang, Liu, Zheng, & Wang, 2017).
- **Carga micróbica.** Cumplen un papel importante en la formación del suelo, pues incorporan y transforman materia orgánica y mineral, translocan iones, partículas y compuestos, protegen al suelo y eliminan sustancias durante la formación del suelo (Osman, 2013).
- **Edad del suelo.** Desempeña un papel importante en la formación y desarrollo del suelo. La condición del suelo está reflejada por el tiempo en el que los factores formadores han ejercido su influencia, como cualquier cuerpo histórico el suelo posee una edad: edad absoluta corresponde al lapso de tiempo desde su formación inicial hasta el presente, y la edad relativa la cual indica la tasa de cambio de las fases del proceso y desarrollo de la formación del suelo (Matchavariani, 2019).

1.4.6 Contaminación del suelo por hidrocarburos

Proceso de degradación debido a la presencia de sustancias perjudiciales que genera afecciones a la salud humana, animal y vegetal (FAO, 2018). Como contaminantes principales del suelo se puede mencionar a los hidrocarburos aromáticos policíclicos; el petróleo y sus derivados, pesticidas, metales pesados y clorofenoles (Chen et al., 2015).

La contaminación del suelo por HAPs es un grave problema ambiental a nivel mundial, se genera por la progresiva demanda de combustibles fósiles, derivados del petróleo y por la rápida industrialización (Patowary, Patowary, & Devi, 2016).

1.4.7 Método biológico de remediación de suelos

1.4.7.1 Biorremediación ambiental

Se define a la Biorremediación como un conjunto de técnicas que permite remediar matrices contaminadas, empleando la capacidad natural de los microorganismos, hongos, plantas o enzimas para degradar, eliminar y transformar los contaminantes presentes en el ambiente (Adetutu et al., 2012).

La degradación de contaminantes puede mejorarse a través de los siguientes enfoques: a) bioatenuación, b) bioestimulación y c) bioaumentación (Redfern, Gardner, Hodzic, Lee, et al., 2019). El acondicionamiento del suelo mediante la optimización de pH del suelo, la aireación, disponibilidad de agua y la accesibilidad del aceptador de electrones y contaminantes promueve la biodegradación de los contaminantes presentes en el suelo (Qingmei Liu et al., 2018).

Este tipo de tecnología posee ciertas ventajas como la viabilidad, rentabilidad y el potencial para remediar el medio sin afectar el ambiente llegando a tener una mayor aceptación estética y pública, además, es un proceso donde los contaminantes son destruidos completamente o reducidos por los microorganismos (Almustapha et al., 2009; Redfern, Gardner, Hodzic, Ferguson, et al., 2019; Varjani & Upasani, 2017); sin embargo, se presentan algunas limitaciones que incluyen las condiciones ambientales, la disponibilidad de aceptores de electrones apropiados, naturaleza de los contaminantes, crecimiento microbiano y metabolismo de los microorganismos (Ramadan, Sari, Rosmalina, & Effendi, 2018).

1.4.7.2 Factores que influyen en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos

La degradación de hidrocarburos está influenciada por las condiciones ambientales, los cambios bruscos de temperatura, el bajo nivel nutricional y los bajos contenidos de humedad.

1.4.7.2.1 Temperatura

Cuando la temperatura es alta se incrementa la solubilidad de los contaminantes hidrófobos y se disminuye su viscosidad, por el contrario ocurre a temperaturas bajas ya que se produce un aumento de la viscosidad del contaminante, se reduce la volatilización de los alcanos tóxicos de cadena corta y se disminuye su solubilidad en el agua retrasando el proceso de degradación del contaminante (Aislabie, Saul, & Foght, 2006).

Del mismo modo, la temperatura interviene en las actividades microbianas ya que se incrementan a medida que este factor alcanza su nivel óptimo, y disminuye bruscamente con el aumento excesivo de la temperatura; a temperaturas mínimas las tasas metabólicas tienden a cero. El rango óptimo de temperatura en donde la actividad metabólica alcanza su nivel máximo varía de acuerdo al tipo de microorganismos presentes en el medio contaminado (Naseri, Barabadi, & Barabady, 2014).

1.4.7.2.2 Humedad

Es un factor que influye en: la disponibilidad de oxígeno en el suelo, en el nivel de toxicidad del contaminante, la distribución de especies, crecimiento y movimiento de los microorganismos (Naseri et al., 2014; Decesaro et al., 2017); su contenido optimo varía entre 50 y 80% (Chaudhary & Kim, 2019).

1.4.7.2.3 Población microbiana

La presencia de xenobióticos y el tiempo de permanencia en el suelo generan reducción de la biomasa microbiana debido a la toxicidad producida por hidrocarburos de alto peso molecular, todo lo contrario ocurre cuando existe bajas concentraciones de hidrocarburos (Sakshi et al., 2019); las concentraciones extremadamente bajas inhiben el crecimiento microbiano debido a la baja concentración de carbono (Varjani & Upasani, 2017).

1.4.7.2.4 Disponibilidad de nutrientes

Los nutrientes influyen directamente en las actividades de los microorganismos, los principales nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano son carbono, nitrógeno y fósforo (Chaudhary & Kim, 2019). El aporte adecuado de nutrientes, favorece la actividad metabólica incrementando la tasa de biodegradación del contaminante (Couto et al., 2014).

En áreas contaminadas con petróleo, los niveles de carbono son elevados por la degradación de moléculas de hidrocarburos, mientras que el nitrógeno y el fósforo llegan a agotarse rápidamente (Sihag, Pathak, & Jarol, 2014).

1.4.7.2.5 pH del suelo

Un cambio brusco de pH en el suelo disminuye la biodegradación de los contaminantes debido a la alteración de las funciones celulares de los microorganismos (Naseri et al., 2014). La alteración del pH del suelo se da por la generación de algunos ácidos orgánicos en el proceso de biorremediación y los efectos de algunos nutrientes añadidos, afectando la biodisponibilidad del contaminante, la transferencia de masa y la tasa de metabolismo microbiano alterando significativamente la eficiencia del proceso de biorremediación (Mohan, Kisa, Ohkuma, Kanaly, & Shimizu, 2006).

Mantener un nivel óptimo de pH y controlar la acidez del suelo es primordial para lograr una adecuada biodegradación; conviene señalar que el pH óptimo para el desarrollo de los microorganismos varía entre 6.5 y 7.5 (Anjum, Rahman, Masood, & Malik, 2012).

1.4.7.2.6 Disponibilidad de oxígeno en el suelo

La disponibilidad de oxígeno favorece la oxidación microbiana de gran parte de hidrocarburos presentes en el suelo (Speight & El-Gendy, 2018); el oxígeno en el medio puede generar condiciones ideales donde los contaminantes se transforman en compuestos menos peligrosos para los posibles receptores, mejorando el eficacia del proceso degradativo (Juwarkar & Singh, 2010).

1.4.8 Técnicas de biorremediación

Se utilizan para controlar y mitigar ambientes contaminados con hidrocarburos, metales pesados, compuestos orgánicos, agroquímicos, etc. Se aprovechan los microorganismos y organismos vivos para reducir, eliminar, acumular y transformar los contaminantes presentes en el suelo en productos menos tóxicos (Tabak, Lens, van Hullebusch, & Dejonghe, 2005).

Las estrategias de biorremediación se dividen en dos categorías dependiendo del sitio de aplicación: biorremediación *in-situ* y biorremediación *ex-situ*, en la Figura 1 se resumen las estrategias de biorremediación más empleadas (Chaudhary & Kim, 2019).

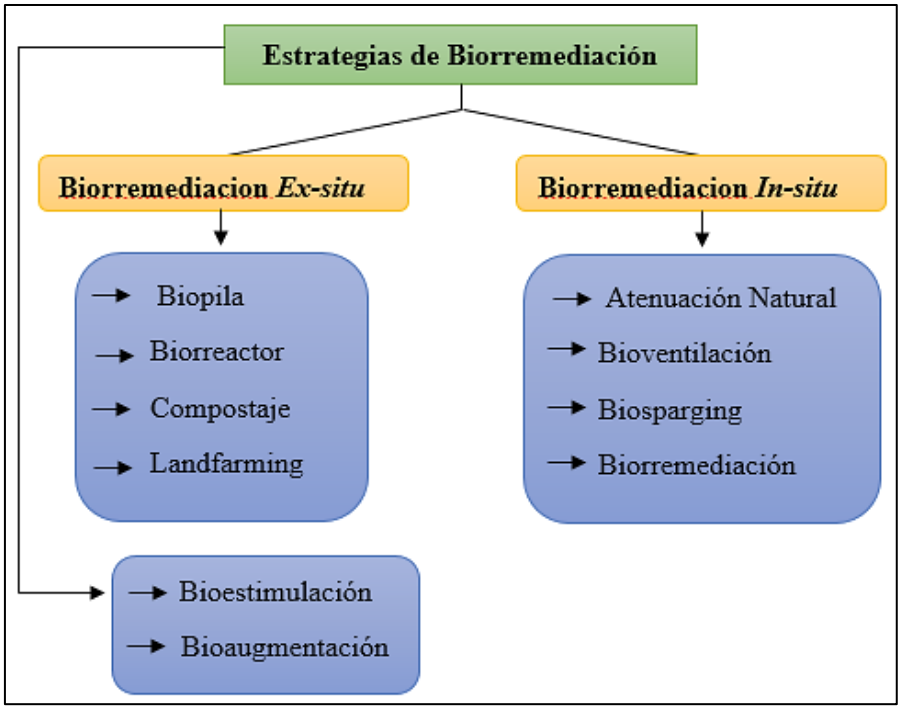


Figura 1. Estrategias de biorremediación *in situ* y *ex situ*
Fuente: *Los Autores*

1.4.8.1 Biorremediación *ex-situ*

Consiste en excavar y transportar el suelo contaminado a un lugar seguro para un tratamiento eficiente, la selección de una tecnología de biorremediación *ex-situ* se la realiza tomando en cuenta la ubicación geográfica del área contaminada, la peligrosidad y la naturaleza del contaminante (Chaudhary & Kim, 2019).

Esta técnica presenta varias ventajas, ya que no requiere de una evaluación inicial del lugar contaminado antes de realizar la remediación, se puede gestionar adecuadamente el entorno en el que se llevará a cabo el tratamiento de remediación y es utilizada en el tratamiento de grandes cantidades de contaminantes (Azubuike, Chikere, & Okpokwasili, 2016). Sin embargo, presenta algunas desventajas, pues genera riesgo de una posible dispersión de la contaminación en el transcurso de la excavación y el transporte, y produce un costo adicional (Kuppusamy, Palanisami, Megharaj, Venkateswarlu, & Naidu, 2016; Tomei & Daugulis, 2014).

En definitiva, se emplea la biorremediación *ex-situ* cuando se requiere un alto grado de tratamiento, si el área contaminada es de fácil acceso para la excavación y si la concentración del contaminante se encuentra en la capa superficial del suelo (Tomei & Daugulis, 2014).

1.4.8.1.1 Estrategias de biorremediación *ex-situ*

- **Biopilas**

Es una técnica que consiste en el apilamiento del suelo contaminado excavado en un lugar equipado para el control de la aireación, temperatura, humedad y la adición de nutrientes incrementando la actividad microbiana (Azubuike et al., 2016; Chaudhary & Kim, 2019; Ward & Singh, 2004). Su utilización puede reducir la volatización de contaminantes con bajo peso molecular (Azubuike et al., 2016), gracias a la flexibilidad que posee esta tecnología se puede reducir el tiempo de remediación, debido a que se puede incorporar en el diseño de la biopila un sistema de calentamiento y con ello incrementar las actividades microbianas, la disponibilidad de contaminantes y el incremento de la tasa de biodegradación (Aislabie et al., 2006).

- **Biorreactores**

Son recipientes que están diseñados para transformar materias primas en productos a través de reacciones biológicas controladas (Chaudhary & Kim, 2019), esta tecnología utiliza bacterias naturales y cepas inoculadas que son capaces de metabolizar los contaminantes presentes en fases sólidas y líquidas en presencia de condiciones ambientales propicias (Mohan et al., 2006). Se basa en la mezcla de agua con suelo contaminado extraído hasta formar una suspensión la cual es colocada en un reactor (Azubuike et al., 2016), dentro de los parámetros que pueden ser controlados en el biorreactor está la temperatura, pH, agitación, velocidad de aireación, nutrientes, inóculos bacterianos y sustrato, su control puede llegar a reducir eficazmente el tiempo de biorremediación (Azubuike et al., 2016; Tomei & Daugulis, 2014).

- **Compostaje**

Se trata de una mezcla de suelo contaminado con sustancias orgánicas como el estiércol y lodos residuales que posteriormente se colocan en pilas o hileras para compostar (Chaudhary & Kim, 2019), en este proceso intervienen microorganismos mesofílicos y termofílicos que degradan los contaminantes orgánicos a elevadas temperaturas (Sakshi et al., 2019).

- **Landfarming**

Consiste en la excavación del suelo contaminado y la extensión sobre lechos poco profundos, donde periódicamente el suelo se voltea para conseguir condiciones óptimas de aireación para la degradación de los contaminantes (Sakshi et al., 2019); los contaminantes se degradan, transforman y se inmovilizan por medio de reacciones bióticas y abióticas. Landfarming puede ser empleada para tratar volúmenes grandes de suelo contaminado generando un impacto ambiental mínimo (Maila & Cloete, 2005).

1.4.8.2 Biorremediación *in-situ*

Se trata el suelo contaminado en el sitio sin la necesidad de realizar ninguna excavación, ni transporte (Chaudhary & Kim, 2019). La eficiencia del proceso puede verse afectada por la falta de aireación, nutrientes y la tolerancia de los microorganismos para degradar los xenobióticos (Camenzuli & Freidman, 2015).

1.4.8.2.1 Estrategias de biorremediación *in-situ*

- **Atenuación natural**

Generalmente es un proceso de “desprendimiento” que permite a los microorganismo endógenos tratar los contaminantes sin ninguna adición de nutrientes o microorganismos

(Shahsavari, Schwarz, Aburto-medina, & Ball, 2019). Los contaminantes son eliminados a través de la degradación de microorganismos autóctonos, la transformación química, la volatilización, la dispersión, estabilización de los contaminantes y la eliminación del contaminante del suelo (Chaudhary & Kim, 2019).

- **Bioventing**

Se fundamenta en el suministro de oxígeno a la zona no saturada del suelo por medio de un flujo de aire controlado con el propósito de incrementar la actividad microbiana (Chaudhary & Kim, 2019); se emplea la adición de nutrientes y un control de la humedad para mejorar el proceso, de esta forma se logra transformar los contaminantes a un estado menos tóxico (Azubuike et al., 2016).

- **Biosparging**

Consiste en el suministro de aire a la zona saturada del suelo generando un movimiento ascendente de los compuestos orgánicos volátiles a la zona no saturada, favoreciendo el proceso de biorremediación (Azubuike et al., 2016). Los factores que influyen en la efectividad de esta técnica son la permeabilidad del suelo y la biodegradabilidad de los contaminantes, se utiliza para tratar sitios contaminados con diésel y queroseno (Philp & Atlas, 2016).

- **Fitorremediación**

Este método aprovecha la capacidad que tienen ciertas plantas para absorber ciertos contaminantes a través de las raíces. A través de las plantas se extrae, acumula, degrada, filtra, estabiliza y volatiliza los contaminantes presentes en el suelo y el agua (Camenzuli & Freidman, 2015; Chaudhary & Kim, 2019). La efectividad de esta tecnología depende de: la concentración de hidrocarburos de petróleo, la profundidad a la que se encuentra la contaminación, las

condiciones ambientales, las características del suelo y la capacidad de tolerancia de las plantas (Camenzuli & Freidman, 2015; Odoh, Zabbey, Sam, & Eze, 2019).

Entre sus ventajas se destaca que requiere bajos costos de instalación y mantenimiento, es amigable con el medio ambiente, se puede realizar a gran escala, permite conservar la estructura del suelo, previene la erosión y lixiviación de metales, además puede mejorar la fertilidad del suelo debido al aporte de materia orgánica (Azubuike et al., 2016).

- **Bioaumentación**

Se fundamenta en la adición de microorganismos degradantes de contaminantes, incluyendo a cepas bacterianas inoculadas o bacterias genéticamente modificadas, que ayudan a acelerar el proceso de degradación y biodisponibilidad del contaminante (Camenzuli & Freidman, 2015; Mohan et al., 2006). La selección de los microorganismos se la realiza de acuerdo a su capacidad metabólica para degradar los contaminantes (Sakshi et al., 2019).

Los principales problemas que se producen en una matriz dinámica y compleja como el suelo son: la competencia con los microorganismos autóctonos ya sea por sustratos o nutrientes, la depredación por protozoos y bacteriófagos, y la presencia de raíces que generan compuestos orgánicos que afecta el ambiente de crecimiento (Tomei & Daugulis, 2014).

- **Bioestimulación**

Recurso que se basa en suministrar nutrientes en el suelo y optimizar las condiciones abióticas como humedad, aireación, adición de agentes estructurantes, y pH, favoreciendo el desarrollo de microorganismos autóctonos o nativos presentes en el área y evitando la incorporación de microrganismos exógenos al medio (Infante et al., 2010). Es una tecnología muy sencilla y económica, que promueve el crecimiento microbiano e incrementa la biodisponibilidad de los contaminantes a través del uso de surfactantes naturales o sintéticos (Chaudhary & Kim, 2019).

La bioestimulación con nitrógeno estimula el crecimiento celular y mantiene la actividad metabólica de los microorganismos indígenas, elevando la tasa de degradación (Suja et al., 2014). No obstante, si las concentraciones de nitrógeno son altos se puede producir una inhibición de la actividad celular**.** Es por eso, que el nitrógeno y otros nutrientes deben ser agregados considerando las concentraciones disponibles para evitar que la velocidad de degradación de los microorganismos se limite (Espinosa, 2009).

1.4.9 Evaluación de toxicidad del suelo

1.4.9.1 Bioensayo con semillas

Un bioensayo puede ser definido como una prueba que permite evaluar la toxicidad del suelo remediado, la evaluación se realiza de acuerdo a respuestas letales, toxicidad aguda y toxicidad crónica (Brown & Bolivar, 2017; Maestroni et al., 2018). Los bioensayos, son utilizados para detectar la presencia de agentes tóxicos y también para medir riesgos ambientales potenciales, son pruebas confiables, rentables, rápidas y simples. Algunas de las ventajas que ofrece el uso de bioensayos con plantas sobre otros organismos es que pueden ser más sensibles al estrés ambiental, son fáciles de manipular, almacenar y presentan un bajo costo en comparación con otros bioensayos (Valerio, García, & Peinado, 2007).

A través de los bioensayos, se determina la inhibición de la germinación de la semilla y la elongación del hipocótilo y de la raíz de la plántula, los dos últimos son indicadores representativos de la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta permitiendo analizar el efecto tóxico de las sustancias presentes en el suelo que pueden retardar o inhibir el crecimiento de la radícula o el hipocótilo (Khan, Biswas, Smith, Naidu, & Megharaj, 2018). Es así, que la evaluación del efecto en el desarrollo del hipocótilo y de la radícula de las plántulas permite determinar el efecto

tóxico de los hidrocarburos presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación de la semillas (Infante & Morales, 2012; Sobrero & Ronco, 2004).

La especie mayormente utilizada en bioensayos es *Lactuca sativa* (Lechuga) debido a que es una planta de rápido crecimiento, de fácil manipulación, tamaño pequeño y de bajo costo; el empleo de esta especie permite monitorear suelos contaminados con crudos debido a la gran sensibilidad que esta planta presenta (Pernía et al., 2018).

1.4.9 Legislación Ecuatoriana y límites permisibles

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), son regulados por entidades tanto nacionales como internacionales considerando el riesgo que representa para la salud humana y el ambiente (Gavillanes, 2013). En Ecuador existen tres principales normas que regulan la presencia de HAPs en el ambiente como: la Norma Ecuatoriana INEN 1108 para requisitos del agua potable, el Acuerdo Ministerial 28 que sustituyó al TULSMA que regula varios tipos de aguas y suelos, y el Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas (RAOHE) que regula las operaciones relacionadas con hidrocarburos (Acosta, 2016).

En el reglamento sustitutivo del RAOHE, se presentan los límites permisibles en base al uso posterior del suelo.

Tabla 2. Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en toda la fase de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicio.

Parámetro de control	Unidad [1)]	Uso agrícola [2)]	Uso industrial [3)]	Ecosistemas sensibles [4)]
Hidrocarburos Totales		<2500	<4000	<1000
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)		<2	<5	<1
Cadmio	mg/kg	<2	<10	<1

Níquel	<50	<100	<40
Plomo	<10	<500	<80

1) Expresado en base de sustancia seca
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.

Nota: El RAOHE reconoce seis HAPs: Fluoranteno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]Fluoranteno, Benzo[a]pireno, Indeno[1,2,3-c,d]pireno, Benzo[g,h,i]Perileno.
Fuente: (RAOHE, 2010)

De acuerdo al Libro VI Anexo 2 del TULSMA respecto a la Norma de Calidad Ambiental del Recurso Suelo y Criterios de Remediación para Suelos Contaminados, establece 0.1 mg/kg como valor criterio para medir la calidad de suelos contaminados con HAPs. Así mismo, proporciona los criterios de remediación para suelos tomando en cuenta el uso posterior que se va a dar al suelo, los mismos que son presentados en la Tabla 3; los criterios también tiene la finalidad de establecer los valores máximos de concentración de contaminantes en un suelo que se encuentra en proceso de remediación (TULSMA, 2014).

Tabla 3. Criterios de remediación o restauración (Valores máximos de concentración de contaminantes de un suelo).

Sustancia	**Unidades (concentración en peso seco)**	**Uso del suelo**			
		Agrícola	**Residencial**	**Comercial**	**Industrial**
HAPs		<2	--	<5	<1
Benzo[a]Antraceno	mg/kg	0,1	1	1	1
Benzo[a]pirenos		0,1	0,7	0,7	0,7
Naftaleno		0,1	0,6	22	22
Pirenos		0,1	10	10	10

Fuente: (TULSMA, 2014)

CAPITULO 2.-

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se aplicaron diferentes estrategias de bioestimulación con nitrógeno (urea) en microcosmos de suelo contaminado con búnker y que en cuya caracterización se determinó la presencia de HAPs, la cuantificación se hizo mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Método 8100. La valoración del suelo sujeto a biorremediación (toxicidad) se hizo mediante bioensayos con semillas de *Lactuca sativa* (lechuga). La experimentación se realizó en los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Cuenca.

El búnker que se utilizó en el estudio fue suministrado por la Central Termoeléctrica "El Descanso", empresa Electro Generadora del Austro ELECAUSTRO S.A. (Figura 2).

Figura 2. Toma de muestras de búnker
Fuente: Los Autores

2.1 Análisis fisicoquímico del suelo

En base a la siguiente metodología se realizó el análisis fisicoquímico (Ver tabla 4).

Tabla 4. Metodologías para el análisis fisicoquímico.

Parámetro	Método	Referencias
pH	Método potenciómetro	Bates, (1983)
Conductividad eléctrica	Análisis realizado a través del conductímetro	Fernández et al., (2006)
Capacidad de Campo	Método gravimétrico	Shukla et al., (2014)
Carbono orgánico	Método de Walkley-Black	Seidlaboratory (Anexo 1)
Nitrógeno total	Método interno	Seidlaboratory (Anexo 1)

Fuente: Los Autores

2.2 Diseño experimental

El estudio se fundamentó en la relación carbono nitrógeno, bajo los siguientes parámetros C/N de 60:1 y C/N de 100:10 de acuerdo a la revisión del estado del arte (Infante et al., 2010; Leys, Bastiaens, & Verstraete, 2005; Martínes, Lo Balbo, Mac Cormack, & Ruberto, 2015; Martínez, Pérez, Pinto, Gurrola, & Osorio, 2011; Wu, Wu, Zhang, & Ye, 2019).

2.2.1 Preparación de los microcosmos

Los microcosmos se formaron bajo los siguientes criterios (Ver figura 3).

Figura 3. Esquema de la preparación de microcosmos
Fuente: Los Autores

Morales, Ehrmann, & Pernía, (2014) mencionan que la concentración del contaminante para biorremediar matrices contaminadas debe estar entre 5-10%, por tal motivo la concentración de búnker en el estudio fue del 8%. La preparación de los microcosmos se muestra en la Figura 4.

Figura 4. Preparación de microcosmos
Fuente: Los Autores

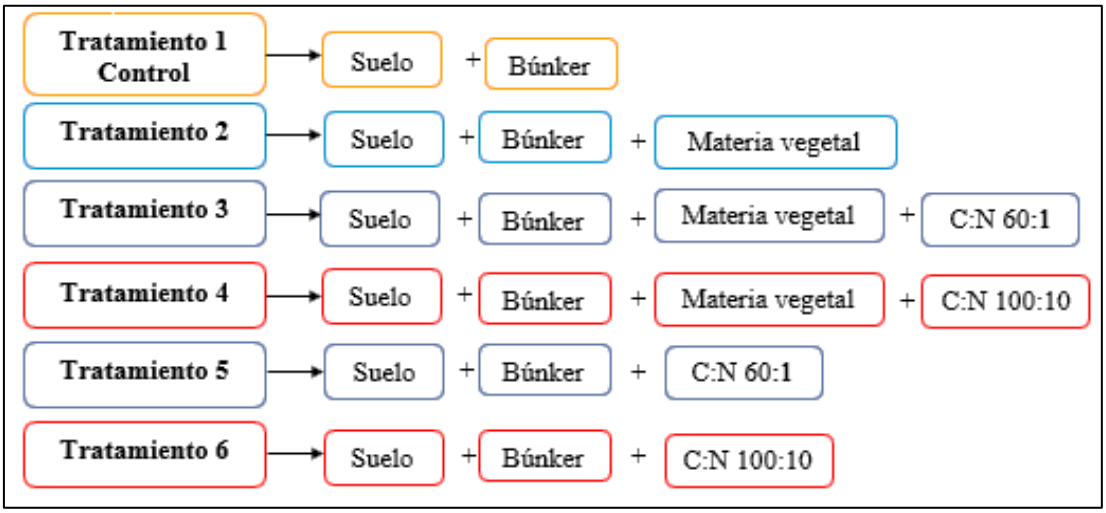
Los microcosmos se prepararon en bandejas de 33.8 x 25.2 x 13.8 cm, con 2 kg de suelo.

Figura 5. Microcosmos de suelo contaminado con búnker
Fuente: Los Autores

Las concentraciones de urea como fuente de nitrógeno (Khayati & Barati, 2017), y su incorporación en los microcosmos se llevó a cabo a través de la metodología aplicada por Martínez, Ruberto, Lo Balboa, & Mac Cormackwp, (2017).

2.2.2 Unidades experimentales

Se evaluaron 6 tratamientos experimentales como se muestra en la Figura 6.



El tratamiento 1 se conformó con suelo contaminado sin adición de enmiendas, en el tratamiento 2 se aplicó materia orgánica vegetal, en los tratamientos 3 y 5 se utilizó la misma relación C/N, con la diferencia que en el T3 se le agregó materia orgánica vegetal, de igual forma en los tratamientos 4 y 6 se empleó la misma relación C/N, con adición de materia orgánica vegetal en el T4.
Figura 6. Tratamientos aplicados
Fuente: Los Autores

2.2.3 Condiciones del ensayo

La conformación y diseño de los tratamientos aplicados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de los microcosmos de suelo para la biorremediación.

Tratamientos	Suelo (kg)	Materia orgánica vegetal (kg)	Búnker (ml)	Urea (g)
Tratamiento 1 (control)	1,84	--	160	--
Tratamiento 2	1,78	0,06	160	--
Tratamiento 3	1,78	0,06	160	3,60
Tratamiento 4	1,78	0,06	160	23,43
Tratamiento 5	1,84	--	160	3,60

Tratamiento 6	1,84	--	160	23,43

Para la conformación de los tratamientos T2, T3 y T4 se tomó en cuenta el peso de la materia orgánica vegetal añadida en aquellos tratamientos, obteniendo una variación en el peso del suelo empleado. La variación en la cantidad de urea, se deben a las respectivas relaciones de C/N utilizadas.
Fuente: Los Autores

El estudio se llevó acabo en un período de 90 días, se controló la capacidad de campo al 50% en peso con adición periódica de agua sin cloro y la aireación mediante el volteo de los microcosmos tres veces por semana para mantener niveles óptimos de oxígeno; la temperatura promedio fue de 18°C.

Al inicio de la experimentación se estableció la concentración inicial de HAPs en el suelo para poder cuantificar el porcentaje de degradación de HAPs al final del experimento. La concentración de HAPs se valoró a los 15, 30, 60 y 90 días (Barrios, Robayo, Prieto, & Cardona, 2017; Bento et al., 2005; Izquierdo, 2013).

2.3 Método de extracción y purificación de las muestras de suelo

Las muestras de suelo de cada microcosmo se tomaron empleando el método de cuarteo, cada muestra fue depositada en fundas ziploc herméticas y etiquetadas. Para identificar y cuantificar los HAPs presentes en el suelo, se utilizó QuEChERS (Método dispersivo AOAC 2007.01).

Para la extracción de la muestra, se colocó 5g de suelo en un tubo falcon de 50 ml y se añadió 10 ml de acetonitrilo (CH_3CN) se agitó por 1 minuto, luego se añadió un sobre de Agilent Bond Elut QuEChERS sal AOAC, se agitó por 1 minuto, y luego se centrifugó a 4000 rpm por 5 minutos (Gavillanes, 2013).

De la solución se tomó 5 ml del sobrenadante, se transfirió a un tubo falcon cónico de 15 ml que contiene un sobre de SampliQ QuEChERS AOAC, se agitó por 1 minuto y centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Con una jeringa se tomó 3 ml del extracto y se filtró por un filtro perinola, finalmente 1 ml de extracto fue colocado en un vial para su posterior análisis en el cromatógrafo

de gases (Downes, 2013). El procedimiento de la extracción y purificación de la muestra de suelo se indica en la Figura 7.

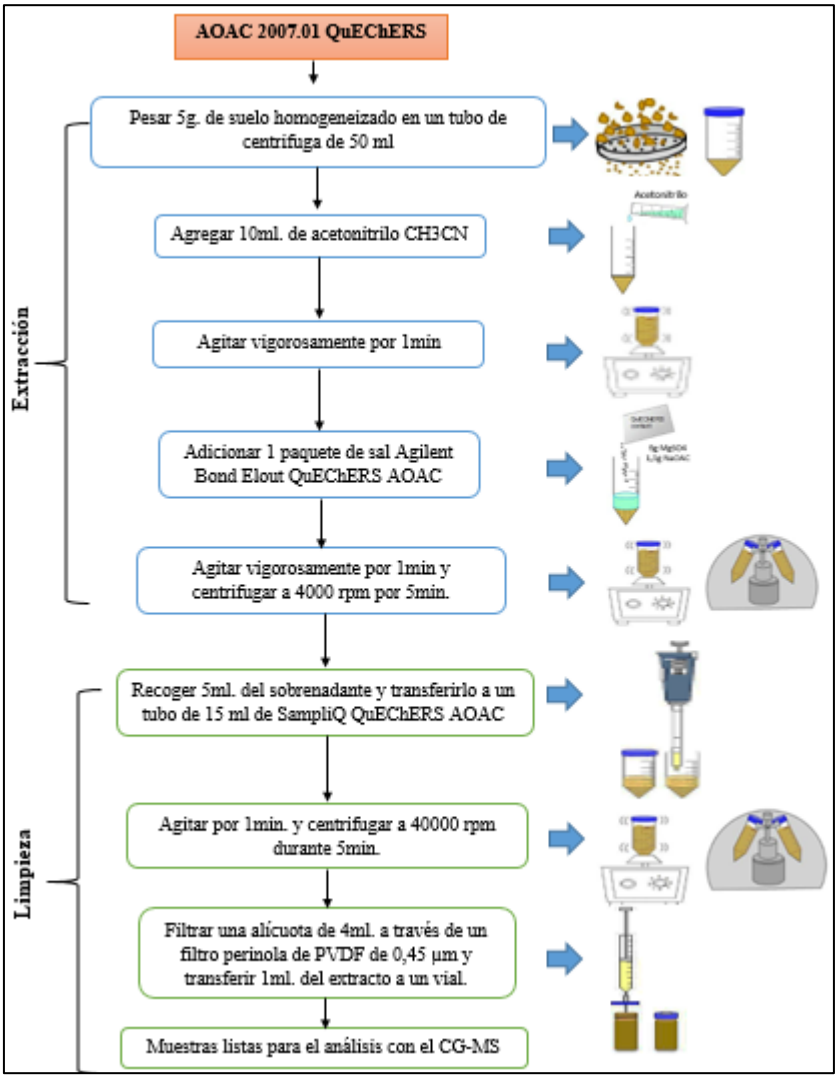


Figura 7. Diagrama del proceso de extracción y depuración del suelo
Fuente: Loa Autores

2.4 Método analítico para determinar la concentración de HAPs

Método 8100 (EPA, 1986) a través de un cromatógrafo de gases marca Thermo Trace CG Ultra, acoplado a un espectrómetro de masas MS ISQ 7000 Single Quadrupole Mass Spectrometer y el uso de un patrón de referencia (PAH-mix9, Dr-Ehrenstorfer, Alemania) en acetonitrilo.

El sistema CG-MS ISQ 7000 se equipó con una columna no polar TG-SQC (15m x 0,25mm de diámetro x 0,25µm de espesor de película), se inyectó un volumen de 1 µL tanto de patrones como de extractos de las muestras. Los rangos de temperatura en el horno fueron: temperatura inicial 80°C durante 1 minuto, rampas de 40°C por minuto hasta alcanzar los 20°C y 5°C por minuto hasta los 325°C, el tiempo total de corrida fue de 35,95 minutos.

El límite de detección del equipo fue de 0.0005-0.005 mg/kg (Balsamo, Riccardino, & Cojocariu, 2019); la cuantificación se hizo por duplicado.

2.5 Evaluación de la toxicidad del suelo luego del proceso de biorremediación

Se utilizaron semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), para evaluar los efectos fitotóxicos de los compuestos residuales presentes en el suelo sujeto a biorremediación, a través del porcentaje de germinación de las semillas y la elongación del hipocótilo y radícula de las plántulas, como indicadores de la calidad del suelo (Moscoso, 2014; Pernía et al., 2018).

Para la medición de la radícula e hipocótilo de la plántula se tomó como referencia la Figura 8.

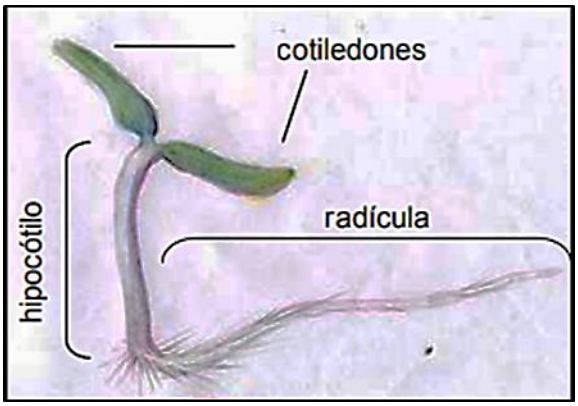


Figura 8. Morfología de una plántula de *Lactuca sativa* (lechuga) germinada
Fuente: (Sobrero & Ronco, 2004)

El ensayo de toxicidad se hizo en cajas Petri de 90 mm, con papel filtro en la base, se realizó 3 repeticiones por tratamiento (Bagur-González, Estepa-Molina, Martín-Peinado, & Morales-Ruano, 2010); para el control se utilizó 4 ml de agua destilada.

Se colocaron 20 semillas utilizando una pinza y se distribuyeron aleatoriamente dejando un espacio entre semilla para permitir la elongación de las radículas (Figura 19).

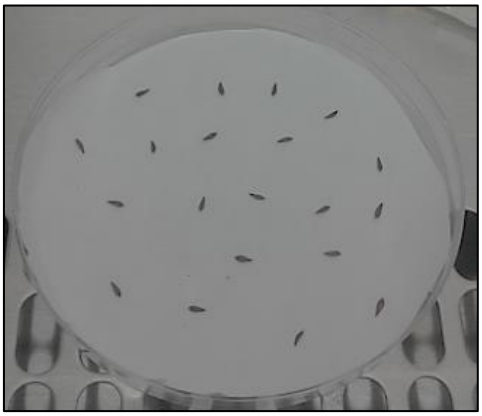


Figura 9. Distribución de las semillas de *Lactuca sativa* en las cajas Petri
Fuente: Los Autores

Cajas Petri de 9 cm se utilizaron como unidades experimentales para evaluar la toxicidad del suelo, las cajas se rotularon y se conservaron en una cámara de germinación a una temperatura de 22°C por un período de tiempo de 120 horas equivalentes a (5 días) (Aparicio et al., 2019).

Para el cálculo del índice de germinación (IG%), el porcentaje de germinación relativa de semillas (GRS%) y el crecimiento relativo de la radícula (CRR%) se utilizó las siguientes expresiones (Atiku, Abdulsalam, & Muhammad, 2018; Hockstra et al., 2002; Rodríguez et al., 2014; Walker et al., 2006)

$$IG\ (\%) = \frac{GRS \times CRR}{100}$$

$$GRS\ (\%) = \frac{\text{Número de semillas germinadas con la muestra de agua problema}}{\text{Número de semillas germinadas en agua dura (testigo)}} \times 100$$

$$\text{CRR}_{(\%)} = \frac{\text{Longitud promedio de la radícula con la muestra de agua problema}}{\text{Longitud promedio de la radícula en agua dura (testigo)}} \times 100$$

2.6 Análisis estadístico

Los grupos de datos se analizaron mediante un ANOVA y posteriormente pruebas de Tukey al 95%. El procesamiento de datos se hizo con el paquete estadístico Minitab® 2018.

CAPÍTULO 3.-

RESULTADOS

3.1 Análisis fisicoquímico del suelo

Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas del suelo.

Análisis fisicoquímico del suelo	
Parámetros	**Resultados**
pH	6,69
Conductividad eléctrica (µS)	240
Humedad (%)	37,6
Carbono orgánico (%)	1,28
Nitrógeno total (%)	0,23

De acuerdo a los resultados, el pH es ligeramente ácido y posee contenidos moderados de carbono orgánico y nitrógeno.
Fuente: Los Autores

3.2 Concentración de HAPs

En la Tabla 7 se muestran los períodos de muestreo para la valoración del proceso de biorremediación de HAPs.

Tabla 7. Períodos de muestreo para la valoración de biodegradación de HAPs.

Muestreos	Días	Fechas	Total
Punto 1	15	12-09-2019	90 días
Punto 2	30	26-09-2019	
Punto 3	60	28-10-2019	
Punto 4	90	28-11-2019	

La cuantificación inicial se hizo luego de 15 días de iniciado el proceso, el segundo análisis a los 30 días, y luego a los 60 y 90 días.
Fuente: Los Autores

Los puntos de muestreo se refieren a los períodos de tiempo en el que se hicieron los análisis con el objetivo de monitorear el proceso de degradación de HAPs.

3.3 Análisis estadístico

El análisis de varianza ANOVA se hizo para establecer la diferencia entre grupos de datos, la prueba de TUKEY al 95% con un nivel de significancia del 0.05 nos sirvió para determinar el mejor tratamiento del grupo de datos.

HIPÓTESIS:

H1= Existe diferencia en la concentración de HAPs en los microcosmos de suelo con respecto al testigo referencial luego de 90 días.

H0= No existe diferencia en la concentración de HAPs en los microcosmos de suelo con respecto al testigo referencial luego de 90 días.

En la Tabla 8 se muestra los resultados de la concentración inicial de HAPs, el Naftaleno, Fenantreno y Criseno se encontró en mayor proporción, igualmente se puede evidenciar que algunos HAPs se hallaron por debajo del límite de detección del equipo.

En el equipo CG-MS, este valor se encuentra en el rango 0.05-0.005 mg/kg (Balsamo et al., 2019).

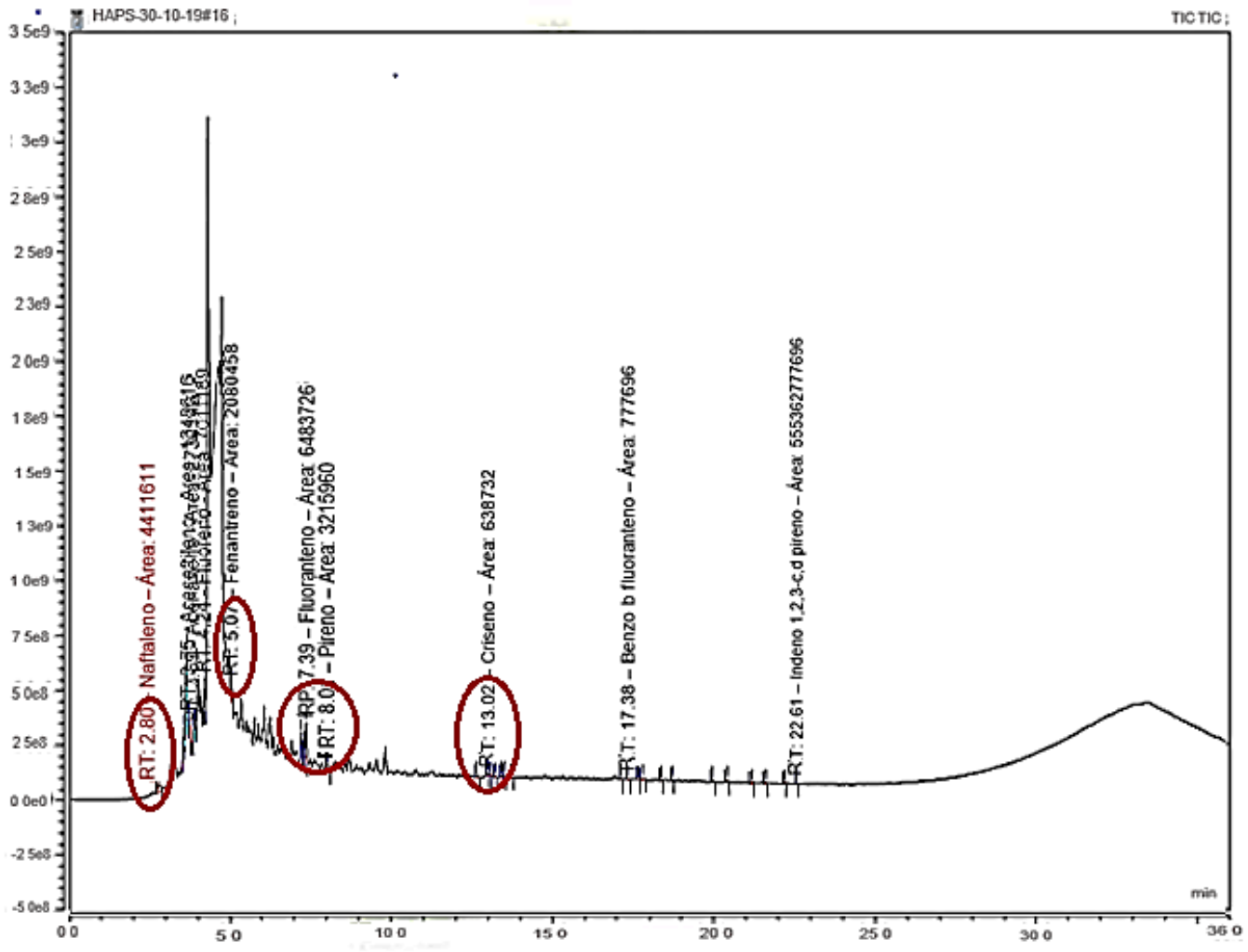
Tabla 8. Resultados del análisis inicial de HAPs por CG-MS del testigo referencial.

Compuesto	Concentración [mg/kg]
Naftaleno	6,576
Acenaftileno	1,291
Acenafteno	2,924
Fluoreno	<0.005
Fenantreno	4,661
Antraceno	<0.005
Fluoranteno	3,944
Pireno	2,928

Benz a antraceno	<0.005
Criseno	4,560
Benzo b fluoranteno	1,721
Benzo k fluoranteno	<0.005
Benzo a pireno	<0.005
Indeno 1,2,3-c,d pireno	1,404
Dinbenz a,h antraceno	<0.005
Benzo g,h,i perileno	<0.005

El Fluoreno, Antraceno, Benz a antraceno, Benzo k fluoranteno, Benzo a pireno, Dibenzo a, h antraceno y Benzo g, h, i perileno se encuentran por debajo del límite de detección del equipo.
Fuente: Los Autores

En el cromatograma del testigo referencial (Figura 10) muestra la presencia de 9 HAPs, los hidrocarburos con mayor concentración son: Naftaleno, Acenafteno, Fenantreno, Fluoranteno, Pireno y Criseno. Para la cuantificación de los compuestos se comparó áreas pico con estándares sustitutos y el tiempo de retención.



Los círculos de color rojo indican los compuestos que se encuentran en mayor concentración.
Figura 100. Cromatograma CG-MS de la muestra en el testigo referencial
Fuente: Los Autores

Punto 1

Concentración de HAPs luego de 15 días de iniciado el proceso (Ver tabla 9).

Tabla 9. Concentraciones de HAPs luego de 15 días.

Compuesto	Concentración [mg/kg]						
	TR	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Naftaleno	6,576	<0.005	<0.005	1,986	2,107	2,053	1,587
Acenaftileno	1,291	1,054	0,956	0,744	0,950	0,810	0,622
Acenafteno	2,924	2,562	2,598	1,971	2,353	2,028	1,759
Fenantreno	4,661	3,493	2,902	2,822	2,975	2,806	2,843
Fluoranteno	3,944	3,188	2,523	1,632	1,339	1,167	0,951

Pireno	2,928	2,491	2,475	2,394	2,207	2,167	1,930
Criseno	4,560	2,867	2,776	2,256	2,114	2,231	1,904
Benzo b fluoranteno	1,721	1,015	0,645	0,603	0,971	0,890	0,964
Indeno 1,2,3-c,d pireno	1,404	1,034	0,774	0,881	0,708	0,808	0,701

Nota: TR= Testigo referencial; **T1**=Tratamiento 1 (Control); **T2**=Tratamiento 2; **T3**=Tratamiento 3; **T4**=Tratamiento 4; **T5**=Tratamiento 5.
Se evidencia que el naftaleno es el primer hidrocarburo que alcanza una mayor reducción en su concentración, esto puede deberse a su relativa volátil en el ambiente o a ser evaporado en el momento del análisis debido a que la técnica de cromatografía emplea altas temperaturas. Los tratamientos tienen concentraciones diferentes de urea, el T3 y T5 tienen 3.60 g, mientras que el T4 y T6 contienen 23,43 g.
Fuente: Los Autores

(Ver Anexo 2) cromatogramas de las concentraciones de HAPs a los 15 días de experimentación.

ANOVA del testigo referencial y de los tratamientos (T1-T6) luego de 15 días.

HIPÓTESIS:

H1: Existe diferencia en la concentración de HAPs en los microcosmos de suelo con respecto al testigo referencial luego de 15 días.

H0: No existe diferencia en la concentración de HAPs en los microcosmos de suelo con respecto al testigo referencial luego de 15 días.

Tabla 10. Resultados del ANOVA a los 15 días de experimentación.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	6	21,38	3,563	3,05	0,012
Error	56	65,45	1,169		
Total	62	86,83			

Se rechaza la hipótesis nula (H0); el valor P es menor al valor de significancia 0.05, existe diferencia entre el grupo de datos.
Fuente: Los Autores

Se realizó el análisis de Tukey para determinar el mejor tratamiento (Tabla 11).

Tabla 11. Prueba de Tukey con un nivel de confianza de 95%.

Factor	N	Media	Agrupación

TR	9	3,334	A	
T1	9	1,967	A	B
T2	9	1,746		B
T3	9	1,742		B
T4	9	1,698		B
T5	9	1,662		B
T6	9	1,473		B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

El testigo referencial con respecto a T2, T3, T4, T5 y T6 son diferentes estadísticamente, debido a que no comparten literales; sin embargo, T1 con respecto a TR estadísticamente no son diferentes.
Fuente: Los Autores

En la Figura 11 se muestra que los tratamientos T6, T3 y T5 presentaron respectivamente una mayor reducción en la concentración de HAPs en comparación con los demás tratamientos.

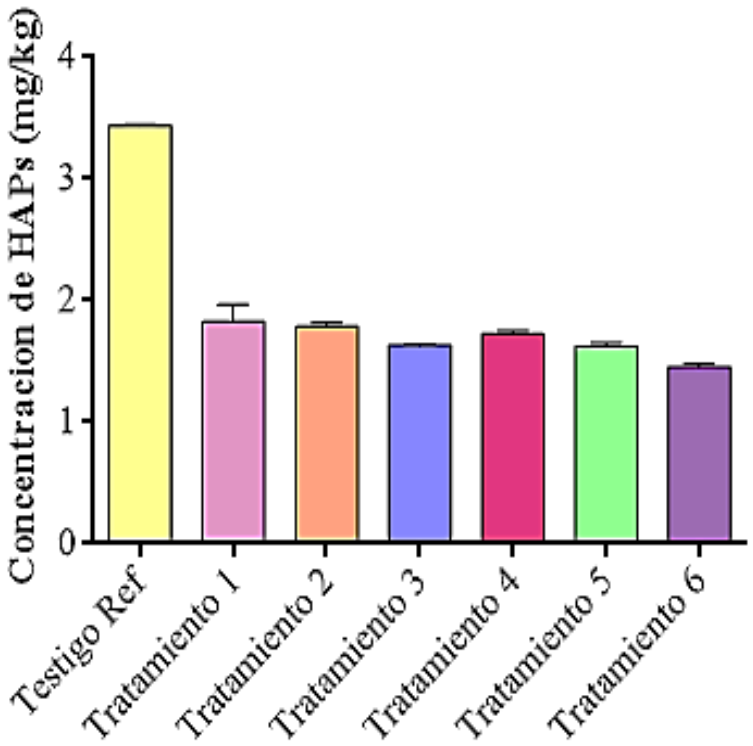


Figura 111. Diagrama de cajas de la concentración de HAPs a los 15 días.
Fuente: Los Autores

Los resultados obtenidos indican que se aprueba la hipótesis alternativa, debido a que existe reducción de la concentración de HAPs en todos los tratamientos luego de un período de 15 días.

Punto 2

Resultados de la concentración de HAPs luego de 30 días de iniciado el proceso (Tabla 12).

Tabla 12. Concentración de HAPs a los 30 días.

Compuestos	Concentración [mg/kg]						
	TR	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Naftaleno	6,576	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	0,234	<0.005
Acenaftileno	1,291	0,475	0,229	0,050	0,086	0,585	0,199
Acenafteno	2,924	2,219	2,074	2,276	2,038	2,220	1,905
Fenantreno	4,661	2,396	2,162	2,285	2,427	2,130	1,485
Fluoranteno	3,944	2,128	1,560	1,369	1,163	1,109	0,874
Pireno	2,928	1,847	1,807	1,883	1,809	2,047	1,613
Criseno	4,560	1,505	2,029	1,806	1,491	1,518	1,232
Benzo b fluoranteno	1,721	0,503	0,506	<0.005	0,657	0,735	0,782
Indeno 1,2,3-c,d pireno	1,404	0,699	0,499	0,786	<0.005	0,255	0,691

El Naftaleno se encuentra por debajo del límite de detección del equipo, de igual manera sucede con el Benzo b fluoranteno e Indeno 1,2,3-c,d en los tratamientos T3 y T4 respectivamente.
Fuente: Los Autores

(Ver Anexo 3) cromatogramas de HAPs a los 30 días de experimentación.

ANOVA del testigo referencial y los tratamientos (T1-T6) luego de 30 días.

HIPÓTESIS:

H1: Existe diferencia en la concentración de HAPs en los microcosmos de suelo con respecto al testigo referencial luego de 30 días.

H0: No existe diferencia en la concentración de HAPs en los microcosmos de suelo con respecto al testigo referencial luego de 30 días.

El ANOVA de los grupos de datos se muestra en la Tabla 13, donde se determinó la significancia de cada uno de los tratamientos a los 30 días de iniciado el proceso.

Tabla 13. Resultado ANOVA luego de los 30 días de experimentación.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	6	37,19	6,198	5,69	0,000
Error	56	60,96	1,089		
Total	62	98,15			

Se rechaza la hipótesis nula (H0), el valor P es menor al valor de significancia del 0.05.
Fuente: Los Autores.

Se realizó el análisis de Tukey para determinar el mejor tratamiento (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

Factor	N	Media	Agrupación
TR	9	3,334	A
T1	9	1,330	B
T2	9	1,207	B
T5	9	1,204	B
T3	9	1,161	B
T4	9	1,074	B
T6	9	0,976	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

El testigo referencial con respecto a T1, T2, T3, T4, T5, T6 son diferentes estadísticamente debido a que no comparten literales. Sin embargo, todos los tratamientos poseen un rango de significación similar por lo que no son significativamente diferentes.
Fuente: Los Autores

La Figura 12 muestra que los tratamientos T6, T4 y T3 presentaron mayor reducción en la concentración de HAPs en comparación con los demás tratamientos.

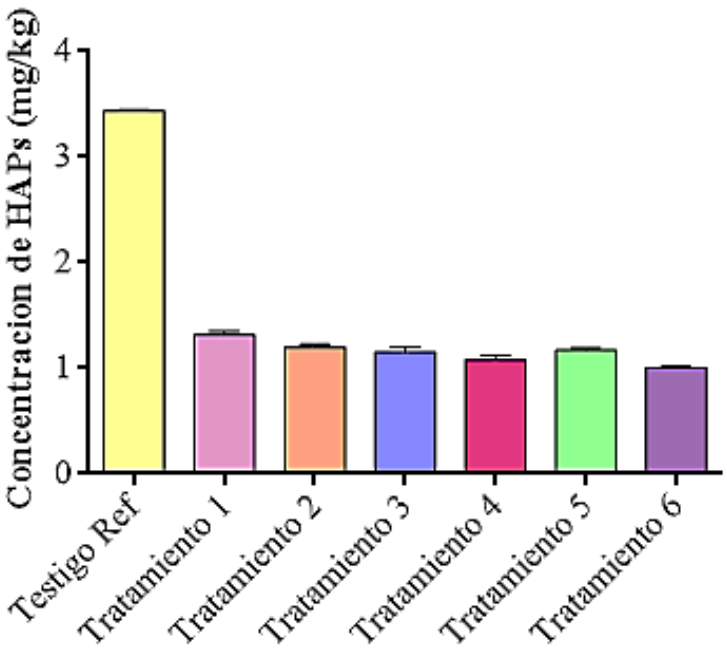


Figura 122. Diagrama de caja de las concentraciones de HAPs a los 30 días
Fuente: Los Autores

Los resultados obtenidos muestran que se aprueba la hipótesis alternativa, debido a la reducción de la concentración de HAPs en todos los tratamientos, luego de un período de 30 días.

Punto 3

En la Tabla 15 se muestra las concentraciones de HAPs a los 60 días.

Tabla 15. Concentración de HAPs a los 60 días.

Compuestos	**Concentración [mg/kg]**						
	TR	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**	**T6**
Naftaleno	6,576	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Acenaftileno	1,291	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	0,052	<0.005
Acenafteno	2,924	1,077	1,008	1,510	1,657	0,948	1,215
Fenantreno	24,661	0,742	0,321	1,308	1,595	1,255	0,827
Fluoranteno	3,944	0,573	0,717	0,904	0,988	0,645	0,653
Pireno	2,928	1,363	1,437	1,374	1,285	1,300	1,060
Criseno	4,560	0,477	0,943	0,666	0,515	<0.005	0,334
Benzo b fluoranteno	1,721	<0.005	<0.005	<0.005	0,333	<0.005	<0.005

Indeno 1,2,3-c,d pireno	1,404	0,247	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005

Naftaleno, Acenaftileno, Criseno, Benzo b fluoranteno e Indeno 1,2,3-c pireno se encuentran por debajo del límite de detección del equipo.
Fuente: Los Autores

(Ver Anexo 4) cromatogramas a los 60 días de experimentación.

ANOVA del testigo referencial y los tratamientos (T1-T6) a los 60 días.

HIPÓTESIS:

H1: Existe diferencia en la concentración de HAPs en los microcosmos de suelo con respecto al testigo referencial luego de 60 días.

H0: No existe diferencia en la concentración de HAPs en los microcosmos de suelo con respecto al testigo referencial luego de 60 días.

El análisis ANOVA de los grupos de datos luego de 60 días se muestra en la tabla 16.

Tabla 16. Resultado ANOVA luego de los 60 días de experimentación.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	6	60,60	10,1001	13,74	0,000
Error	56	41,15	0,7349		
Total	62	101,75			

El valor P es menor al valor de significancia 0.05, por lo que se rechaza la hipótesis nula (H0) y se acepta la H1.
Fuente: Los Autores

En la Tabla 17 se indica los resultados de la prueba de Tukey.

Tabla 17. Prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

Factor	N	Media	Agrupación
TR	9	3,334	A
T4	9	0,708	B
T3	9	0,640	B
T1	9	0,498	B
T2	9	0,492	B

T5	9	0,467	B
T6	9	0,454	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Las concentraciones del testigo referencial con respecto a T1, T2, T3, T4, T5, T6 son diferentes estadísticamente, debido a que no comparten literales; sin embargo, todos los tratamientos tienen un comportamiento similar.
Fuente: Los Autores

En la Figura 13 se muestra que los tratamientos T6 y T5 muestran mayor eficiencia en la degradación de las concentraciones de HAPs en comparación con los demás tratamientos,

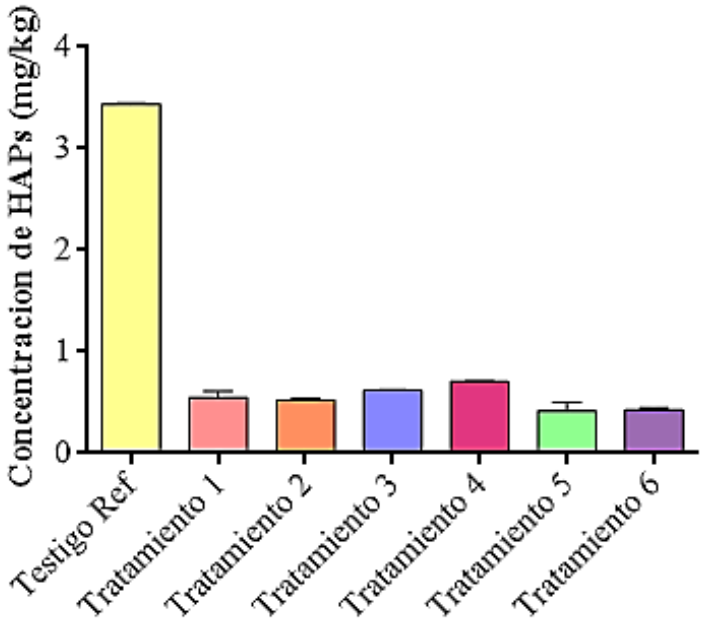


Figura 133. Diagrama de cajas de las concentraciones de HAPs a los 60 días
Fuente: Los Autores

Los resultados obtenidos indican que se aprueba la hipótesis alternativa, existe una reducción de la concentración de HAPs en todos los tratamientos, luego de un período de 60 días.

Punto 4

La Tabla 18 muestra las concentraciones de HAPs al final del proceso, se observó que las concentraciones de cada uno de los componentes mostraron una reducción significativa, los

tratamientos T5 y T6 presentaron mayor reducción de la concentración de HAPs, mientras que en los tratamientos T2, T3 y T4 sucedió lo contrario.

Tabla 18. Concentración de HAPs transcurrido los 90 días de experimentación.

Compuestos	Concentración [mg/kg]						
	TR	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Naftaleno	6,576	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Acenaftileno	1,291	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Acenafteno	2,924	0,583	0,453	0,717	0,654	0,110	0,113
Fenantreno	4,661	0,162	<0.005	1,034	0,762	<0.005	<0.005
Fluoranteno	3,944	<0.005.	0,571	0,720	<0.005	<0.005	0,104
Pireno	2,928	0,242	0,225	<0.005	<0.005	0,883	<0.005
Criseno	4,560	0,333	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Benzo b fluoranteno	1,721	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Indeno 1,2,3-c,d pireno	1,404	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005

La concentración de la mayoría de los hidrocarburos se encuentra por debajo del límite de detección del equipo, mientras que la concentración del Acenafteno se encuentra fuera del límite en todos los tratamientos, probablemente este compuesto fue fuertemente absorbido por los sedimentos de textura arcillosa.
Fuente: Los Autores

(Ver Anexo 5) cromatogramas luego de 90 días de experimentación.

ANOVA del testigo referencial y de los Tratamientos (T1-T6) luego de 90 días.

HIPÓTESIS:

H1: Existe diferencia en la concentración de HAPs en los microcosmos de suelo con respecto al testigo referencial luego de 90 días.

H0: No existe diferencia en la concentración de HAPs en los microcosmos de suelo con respecto al testigo referencial luego de 90 días.

Los resultados del análisis ANOVA se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Resultado ANOVA de los 90 días de experimentación.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	6	78,91	13,1521	25,72	0,000
Error	56	28,64	0,5114		
Total	62	107,55			

Se rechaza la hipótesis nula (H0), el valor P es menor al valor de significancia 0.05 existe diferencia entre el grupo de datos analizado.
Fuente: Los Autores

En la Tabla 20 se muestra los resultados de la prueba de Tukey.

Tabla 20. Prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

Factor	N	Media	Agrupación
TR	9	3,334	A
T3	9	0,274	B
T4	9	0,157	B
T1	9	0,1467	B
T2	9	0,1388	B
T5	9	0,1103	B
T6	9	0,0241	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

El testigo referencial con respecto a T1, T2, T3, T4, T5, T6 es diferente estadísticamente, debido a que no comparten literales.
Fuente: Los Autores

La Figura 14 indica que los tratamientos T6 y T5 presentaron una mayor reducción de las concentraciones de HAPs en comparación con los demás tratamientos y el testigo referencial; sin embargo, todos los tratamientos mostraron rendimientos similares en la degradación del contaminante alcanzando una eliminación mayor al 90%.

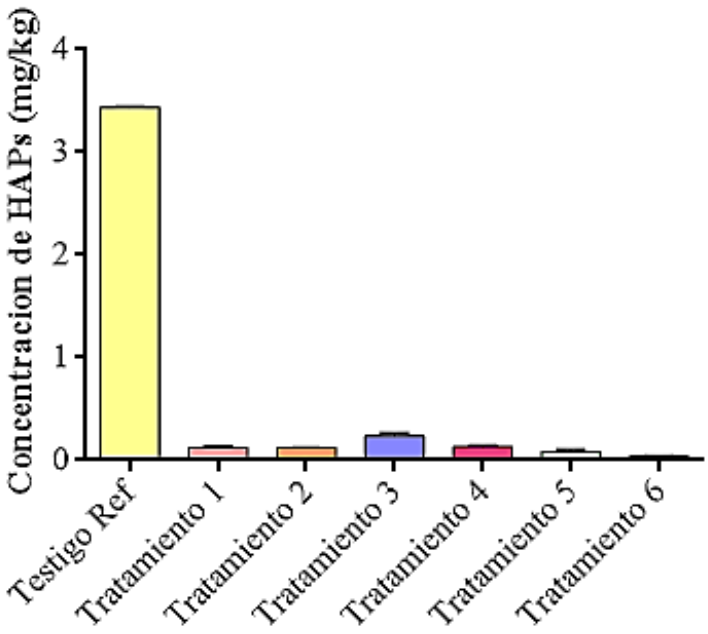


Figura 144. Diagrama de caja de las concentraciones de HAPs a los 90 días
Fuente: Los Autores

De acuerdo a los resultados se acepta la hipótesis alternativa H1, existe una reducción significativa de la concentración de HAPs en todos los tratamientos luego de un período de 90 días.

La Figura 15 muestra la variación de la concentración de HAPs de acuerdo al tiempo de biorremediación.

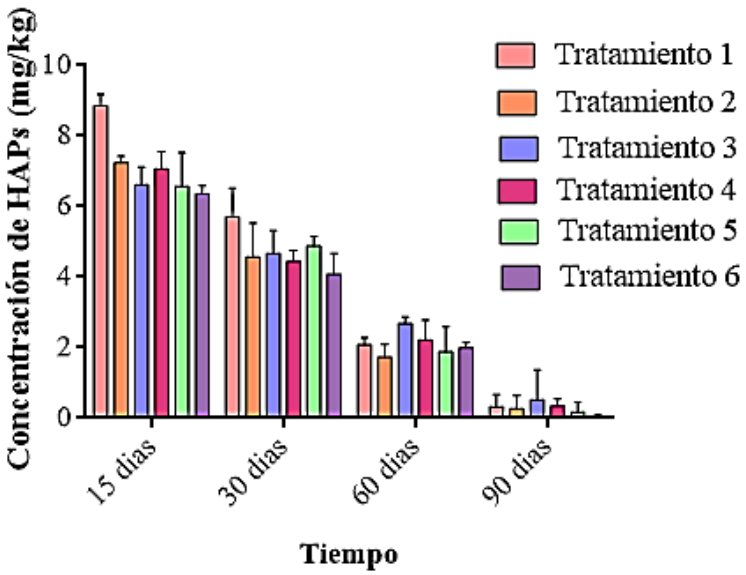
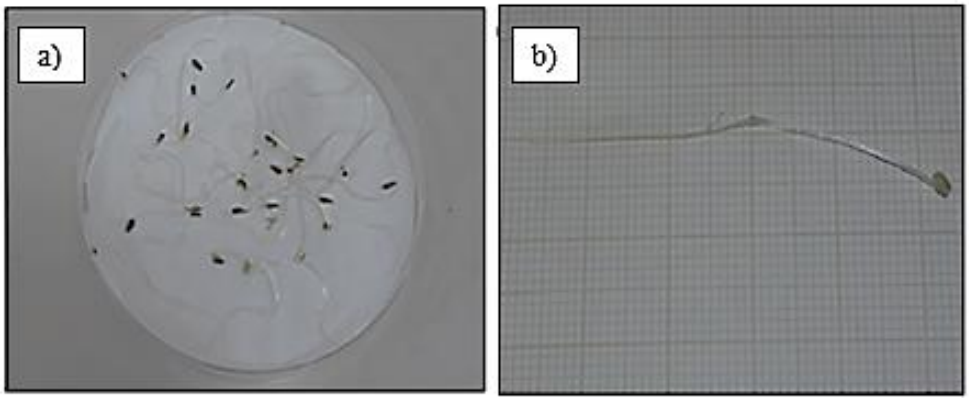


Figura 155. Variación de la concentración de HAPs durante el proceso de biorremediación
Fuente: Los Autores

3.4 Valoración de la toxicidad del suelo

3.4.1 Bioensayo con semillas de Lechuga (*Lactuca sativa)*

La Figura 16 se muestra las semillas germinadas (16-a) y la medición de hipocótilos y radículas de las plántulas (16-b). La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocótilo constituyen indicadores representativos para determinar la capacidad de desarrollo de la planta.



El número de semillas germinadas en cada tratamiento fue entre 17-20 semillas
Figura 166. Plántulas de lechuga (a) Semillas de lechuga germinadas, (b)medición de las plántulas
Fuente: Los Autores

La Tabla 21 muestra que todos los tratamientos tuvieron un porcentaje de germinación mayor al 95% evidenciando que el suelo no genera efectos tóxicos en la germinación de las semillas, los resultados fueron comparados con los criterios de Poi De Neiff y Ramos quienes consideran un suelo tóxico cuando los porcentajes de germinación se hallan entre 75 y 90% en comparación con el testigo referencial (Lallana, Elizalde, Lallana, & Billard, 2008). El cálculo de los porcentajes de germinación permite probar si el suelo biorremediado altera los procesos de germinación de las semillas.

Tabla 21. Porcentaje de germinación de las semillas de *Lactuca sativa*.

Tratamientos	% de germinación
C	100%
T1	95%
T2	95%
T3	93%
T4	96%
T5	93%
T6	98%

C= prueba realizada con agua destilada que permite evaluar el desarrollo de las plántulas en todos los tratamientos.
Fuente: Los Autores

3.4.2 Índice de germinación de las semillas de lechuga (*Lactuca sativa)*

Los resultados de los índices de germinación de cada tratamiento se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Índices de germinación de cada tratamiento.

Tratamientos	Índice de germinación
T1	62,89%
T2	53,97%
T3	40,59%
T4	47,30%
T5	68,65%
T6	74,98%

El índice de germinación se expresa mediante el porcentaje de semillas germinadas y el porcentaje de desarrollo que alcanza la radícula durante el bioensayo; es decir, a mayor índice de germinación menor es el efecto tóxico que se produce en la semilla.
Se observa que el menor índice de germinación se reporta en el tratamiento T3.
Fuente: Los Autores

Los resultados del análisis de los grupos de datos referentes al desarrollo de la longitud del hipocótilo y la radícula, se hizo mediante un ANOVA y una prueba de Tukey con un valor de significancia del 0.05.

3.4.3 Desarrollo del hipocótilo de las semillas de *Lactuca sativa*

Los resultados de las mediciones del hipocótilo en cada tratamiento se presentan en la Tabla 23; el bioensayo se realizó por triplicado para cada tratamiento.

Tabla 23. Longitud del hipocótilo de las semillas de *Lactuca sativa*.

	Longitud del hipocótilo [cm]						
Replicas	**C**	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**	**T6**
B1	3,49	2,98	3,01	2,76	3,50	3,36	3,19
B2	3,26	3,46	3,40	3,09	3,09	3,11	3,39
B3	3,20	3,28	3,20	1,89	2,91	3,29	3,30
Promedio	**3,32**	**3,24**	**3,20**	**2,58**	**3,17**	**3,25**	**3,29**
El hipocótilo es el espacio entre la radícula y la yema de la semilla							

B1= Replica 1, **B2**= Replica 2, **B3**= Replica 3.
Los datos indican que el T6, T5 y T1 generan poco impacto en la elongación del hipocótilo, mientras que el T3 produce mayor afectación en el desarrollo del hipocótilo.
Fuente: Los Autores

El análisis ANOVA, determinó la significancia de cada uno de los tratamientos en el desarrollo del hipocótilo (Tabla 24).

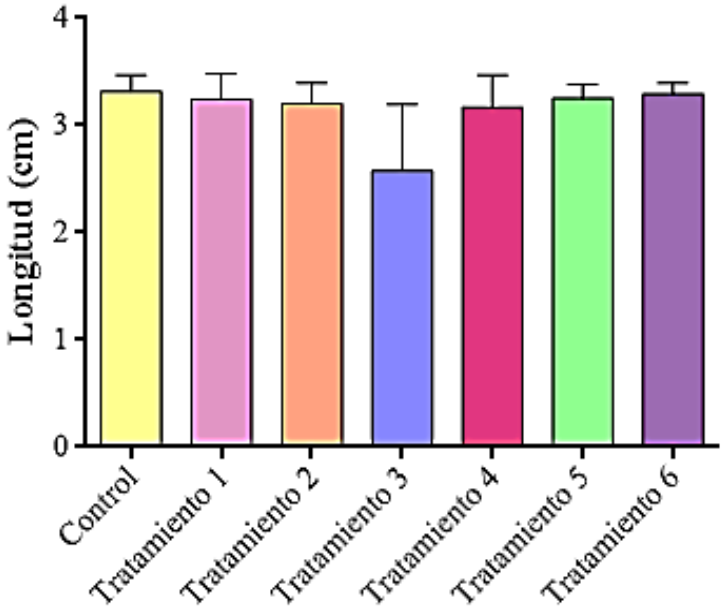
Tabla 24. Resultados ANOVA de la longitud del hipocótilo.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	6	1,185	0,19756	2,22	0,103
Error	14	1,245	0,08895		
Total	20	2,431			

El valor P es mayor al nivel de significancia del 0.05, es decir, las medias del Control y de los Tratamientos no son estadísticamente diferentes.

Fuente: Los Autores

La Figura 17 muestra los resultados de la elongación del hipocótilo de *Lactuca sativa* en los diferentes tratamientos, el tratamiento T3 generó mayor inhibición en el crecimiento del hipocótilo.



La figura indica que el suelo del tratamiento T3 posiblemente se está destoxificando.
Figura 177. Comparación de elongación de la longitud del hipocótilo de las semillas
Fuente: Los Autores

3.4.4 Desarrollo de la radícula de las semillas de *Lactuca sativa*

Los datos de la Tabla 25 muestran que los tratamientos T3 y T4 presentaron menor desarrollo de la radícula.

Tabla 25. Longitud de la radícula de las semillas de lechuga.

Longitud de la radícula [cm]							
Replicas	**C**	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**	**T6**
B1	4,27	3,04	2,45	1,87	2,59	3,42	3,47
B2	4,48	2,87	2,48	2,01	1,84	3,20	3,36
B3	4,28	2,71	2,47	1,78	1,95	2,96	3,10
Promedio	**4,34**	**2,87**	**2,47**	**1,89**	**2,13**	**3,19**	**3,31**

La radícula es la primera raíz rudimentaria en el embrión.

En los tratamientos T6 y T5 se produce menor inhibición en el desarrollo de la radícula, lo contrario ocurre en el tratamiento T3.
Fuente: Los Autores

Los resultados del análisis ANOVA se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26. Resultados ANOVA sobre la longitud de la radícula de las semillas.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	6	12,4479	2,07465	47,15	0,000
Error	14	0,6160	0,04400		
Total	20	13,0639			

El valor P es menor al valor de significancia del 0.05, existe diferencia entre el grupo de datos analizado.
Fuente: Los Autores

La prueba de Tukey de los grupos de datos se muestra en la Tabla 27.

Tabla 27.Prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

Factor	N	Media	Agrupación		
Control	3	4,3433	A		
T6	3	3,310		B	
T5	3	3,193		B	
T1	3	2,8733		B	C
T2	3	2,46667			C D
T4	3	2,127		B	D
T3	3	1,8867		B	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

El Control con respecto a T1, T2, T3, T4, T5 y T6 es diferente estadísticamente, debido a que no comparten literales; sin embargo, T1 y T2 al compartir un rango de significancia indica que su diferencia no es estadísticamente significativa con el control y los demás tratamientos.
Fuente: Los Autores

La Figura 18, muestra que en los Tratamientos T6 y T5 se generó un mejor desarrollo del crecimiento de la radícula.

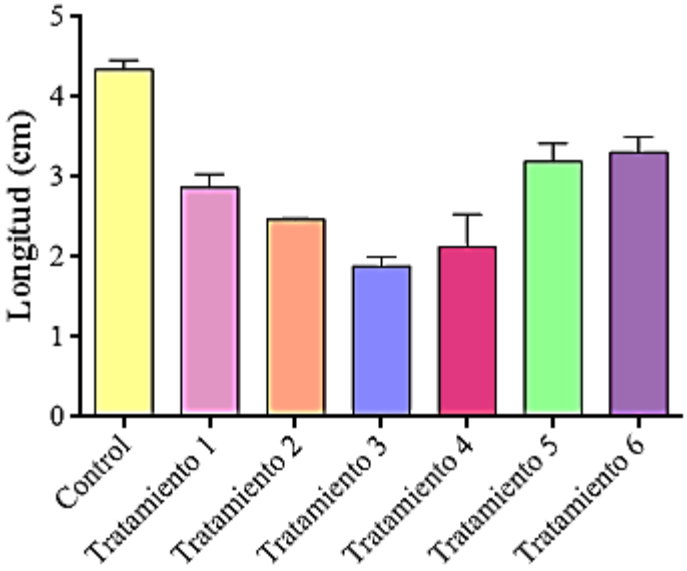


Figura 188. Comparación de elongación de la longitud de la radícula de las semillas
Fuente: Los Autores

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis, se evidenció que existe inhibición en el desarrollo de la radícula en los tratamientos siendo mayor la inhibición en el tratamiento 3.

DISCUSIÓN

En base a los resultados, el tratamiento 6 con una relación C/N de 100:10 presentó mayor efectividad, disminuyéndose la concentración inicial de HAPs de 30.010 mg/kg a 0.218 mg/kg en un período de 90 días, los resultados concuerdan con el estudio de Martínes et al., (2015) quienes con la misma relación C/N obtuvieron una reducción de 1042 mg/kg a 470 mg/kg. De igual manera, el estudio de Otiniano, (2004), menciona que la degradación de hidrocarburos en sistemas terrestres y marinos se acelera por la adición de nitrógeno y fósforo en forma de urea, fosfato y sales de amonio.

En T2, T3 y T4 se pudo evidenciar una menor degradación en la concentración de HAPs, posiblemente por una cantidad elevada de sales en el suelo aumentando su salinidad y por ende reduciendo la degradación de los contaminantes. Lo mencionado coincide con Otiniano, (2004) quien reportó que la salinidad reduce significativamente la degradación del contaminante. Así mismo, Haritash & Kaushik, (2009) mencionan que la comunidad microbiana muestra mayor preferencia por las enmiendas de fácil biodegradación incluido los hidrocarburos de menor peso molecular, coincidiendo con los resultados de la investigación donde los tratamientos T5 y T6 alcanzaron mayor degradación únicamente con la adición de urea.

En todos los tratamientos se alcanzaron tasas de degradación mayores al 90% produciéndose mayor degradación en los primeros días de experimentación, resultados similares fueron reportados por Chemlal et al., (2013), quienes evaluaron el proceso de biorremediación para restaurar un suelo contaminado con diesel mediante el uso de nutrientes, obtuviendo una tasa de degradación del 85% presentando de igual manera mayor la degradacion en los primeros dias. Este comportamiento se debe a la intensa actividad biológica que se produce por una disponibilidad

mayor de carbono, nutrientes y energía que estimulan el crecimiento y respiración de los microorganismos (Sayara, Borràs, Caminal, Sarrà, & Sánchez, 2011).

El porcentaje de germinación de las semillas de *Lactuca sativa* y el desarrollo de su hipocótilo no se vieron afectados, debido a que no se apreció una afectación superior al 50%, lo que concuerda con Infante & Morales, (2012), quienes determinaron que no existe toxicidad cuando no se registra una disminución mayor al 50% del porcentaje de germinación de las semillas y de la elongación del hipocótilo. Sin embargo, en los tratamientos T3 y T4 se presentó afectación en el desarrollo de la radícula, esto posiblemente puede deberse a la presencia de mayor concentración de HAPs en el suelo según lo manifestado por Pernía et al., (2018).

CONCLUSIONES

- En la presente investigación se evaluó la biorremediación de un suelo contaminado con HAPs, basándose en la bioestimulación de microorganismos autóctonos, mediante la adición de urea en relaciones C/N de 100:10 y de 60:1 de acuerdo a la revisión del estado del arte; durante el estudio todos los tratamientos alcanzaron tasas de degradación mayores al 90%, donde el tratamiento 6 con un 99% mostro mayor efectividad en la degradación de HAPs, su relación beneficia los procesos de crecimiento microbiano en el suelo y contribuye a la rápida degradación de hidrocarburos (Leys, Bastiaens, & Verstraete, 2005; Martínez, Pérez, Pinto, Gurrola, & Osorio, 2011; Wu, Wu, Zhang, & Ye, 2019), además demuestra que la bioestimulación mediante la incorporación de urea como fuente de nitrógeno resulto ser un método eficaz para mejorar la biodegradación de HAPs.
- Según el TULSMA y el RAOHE, el límite permisible para un posterior uso agrícola del suelo sujeto al proceso de biorremediación es <2 mg/kg, es así que en base a los resultados del presente trabajo los tratamientos T1, T2, T4, T5 y T6 se encuentran dentro del límite permisible, mientras que el tratamiento T3 sobrepasa este valor debido a que la mayor actividad microbiana se enfocó en la degradación de la materia orgánica fácilmente degradable en lugar de los HAPs y su suelo no puede ser utilizado para la actividad agrícola.
- La germinación de las semillas no se vio alterada por las disoluciones de los tratamientos alcanzando un porcentaje de germinación mayor al 95% indicando que el suelo sujeto a biorremediación no es tóxico, de igual manera no se presentó inhibición en el desarrollo del hipocótilo; sin embargo, en la elongación de la radícula de las plántulas se observó

un efecto desfavorable en los tratamientos T3 y T4, debido a la mayor concentración de HAPs presente en el suelo.

- La bioestimulación con nitrógeno aumento la descomposición de los hidrocarburos, optimizando el proceso de biorremediación de suelos contaminados con búnker, evidenciado por una disminución significativa de la concentración de HAPs. Además, ha demostrado ser una alternativa eficiente, de bajo costo y fácil aplicación para la recuperación de sitios contaminados con hidrocarburos.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta, B. S. (2016). *"Aplicación de la Extracción Líquido-Líquido asistida por Saturación Salina para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en matrices acuosas por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con Detector de Fluorescencia."* Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Retrieved from http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/13232/Monografia Byron Acosta 2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Acuña, A. J., Pucci, O. H., & Pucci, G. N. (2008). Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de Patagonia Argentina, *17*(2), 85–93.

Adam, G., & Duncan, H. J. (2000). Effect of diesel fuel on growth of selected plant species, 353–357.

Adetutu, E. M., Ball, A. S., Weber, J., Aleer, S., Dandie, C. E., & Juhasz, A. L. (2012). Impact of bacterial and fungal processes on 14 C-hexadecane mineralisation in weathered hydrocarbon contaminated soil. *Science of the Total Environment*, *414*, 585–591. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.11.044

Agraz, M. (2015). Diagnóstico del Impacto y Lineamiento Básicos para los Programas de Mitigación y Manejo de Humedales, (July). https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2567.9206

Aislabie, J., Saul, Æ. D. J., & Foght, Æ. J. M. (2006). Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils, 171–179. https://doi.org/10.1007/s00792-005-0498-4

Alizadeh, A. H., & Nomikos, N. K. (2009). Bunker Risk Analysis and Risk Management, 338–339. https://doi.org/https://doi.org/10.1057/9780230235809_10

Almustapha, M. N., Kaura, S. I., Hassan, L. G., Yerima, M. B., Abdulkadir, I., & Salihu, A. (2009). Effects of Lead Concentrations on Biostimulation of Oil-Contaminated Soil Effects of Lead Concentrations on Biostimulation of Oil-Contaminated Soil, (January).

Anjum, R., Rahman, M., Masood, F., & Malik, A. (2012). *Bioremediation of Pesticides from Soil and Wastewater*. (D. Springer, Ed.). https://doi.org/10.1007/978-94-007-1591-2

Aparicio, J. D., Garcia-velasco, N., Urionabarrenetxea, E., Soto, M., Álvarez, A., & Polti, M. A. (2019). Evaluation of the effectiveness of a bioremediation process in experimental soils polluted with chromium and lindane. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *181*, 255–263. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.06.019

Atiku, Y. M., Abdulsalam, S., & Muhammad, I. M. (2018). Biostimulation of Soil Contaminated With Spent Motor Oil Using Cow Dung and Poultry Litter in Land Farming Microcosm. *Journal of Environmental Science*, *12*(3), 1–10. https://doi.org/10.9790/2402-1203020110

Azubuike, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques – classification based on site of application : principles , advantages , limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *32*(180), 3–18. https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x

Bagur-González, M. G., Estepa-Molina, C., Martín-Peinado, F., & Morales-Ruano, S. (2010). Toxicity assessment using Lactuca sativa L . bioassay of the metal (loid)s As , Cu , Mn , Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *Springer*. https://doi.org/10.1007/s11368-010-0285-4

Balsamo, M., Riccardino, G., & Cojocariu, C. (2019). A fast , robust method for routine determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in drinking water by single quadrupole GC-MS. Retrieved from https://assets.thermofisher.com/TFS-

Assets/CMD/Application-Notes/an-10718-gc-ms-pah-drinking-water-an10718-en.pdf?fbclid=IwAR0n7QDZ_3GUfse_i8mwhk9u6O8mCLcYHhvop2elfamTN3AGgEMzbfJzOuM

Barrios, L., Robayo, J., Prieto, S., & Cardona, S. (2015). Biorremediación de Suelos Contaminados con Aceites Usados de Motor Bioremediation of Soils Contaminated With Used Motor Oils, (June).

Bates, D. R. (1983). Scientific Reminiscences, *32*.

Bento, F. M., Camargo, F. A. ., Okeke, B. C., & Frabkenberger, W. T. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation , biostimulation and bioaugmentation, *96*, 1049–1055. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.008

Braibant, C. (2004). *Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por Acinetobacter sp. y Pseudomonas putida para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados*.

Brown, R. E., & Bolivar, S. (2017). The Importance of Behavioural Bioassays in Neuroscience. *Journal of Neuroscience Methods*, 68–76. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.05.022

Buendía Ríos, H. (2012). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante compost de aserrín y estiércoles*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Camenzuli, D., & Freidman, B. L. (2015). On-site and in situ remediation technologies applicable to petroleum hydrocarbon contaminated sites in the Antarctic and Arctic Antarctic and Arctic, *34*(1). https://doi.org/10.3402/polar.v34.24492

Cando Rodríguez, M. Á. (2011). *Determinación y Análisis de un Proceso de Biorremediación de Suelos Contaminados por Hidrocarburos*. Universidad Politécnica Salesiana.

Chaudhary, D. K., & Kim, J. (2019). New insights into bioremediation strategies for oil-contaminated soil in cold environments. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *142*(April), 58–72. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.05.001

Chemlal, R., Abdi, N., Lounici, H., Drouiche, N., Pauss, A., & Mameri, N. (2013). Modeling and qualitative study of diesel biodegradation using biopile process in sandy soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *78*, 43–48. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.12.014

Chen, H., Ma, S., Yu, Y., Liu, R., Li, G., Huang, H., & An, T. (2019). Science of the Total Environment Seasonal pro fi les of atmospheric PAHs in an e-waste dismantling area and their associated health risk considering bioaccessible PAHs in the human lung. *Science of the Total Environment*, *683*, 371–379. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.385

Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., & Zhang, J. (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons , petroleum , pesticides , chlorophenols and heavy metals by composting : Applications , microbes and future research needs. *Biotechnology Advances*, *33*(6), 745–755. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.003

Correa, R., De Souza, C., & De Oliveira, W. (2019). Science of the Total Environment Re fl ectance and imaging spectroscopy applied to detection of petroleum hydrocarbon pollution in bare soils. *Science of the Total Environment*, *649*, 1224–1236. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.231

Couto, N., Fritt-rasmussen, J., Jensen, P. E., Højrup, M., Rodrigo, A. P., & Ribeiro, A. B. (2014). Suitability of oil bioremediation in an Artic soil using surplus heating from an incineration facility. https://doi.org/10.1007/s11356-013-2466-3

Decesaro, A., Machado, T. S., Cappellaro, Â. C., Reinerth, C. O., Thomé, A., & Colla, L. M. (2017). Biosurfactants during in situ bioremediation : factors that influence the production and challenges in evalution. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9778-7

Dias, R. L., Ruberto, L., Hernández, E., Vázquez, S. C., Lo Balbo, A., Del Panno, M. T., & Mac

Cormack, W. P. (2012). Bioremediation of an aged diesel oil-contaminated Antarctic soil : Evaluation of the " on site " biostimulation strategy using different nutrient sources. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *75*, 96–103. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.020

Downes, J. L. (2013). Métodos analíticos de extracción y test de bioaccesibilidad de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) en sedimentos de las Islas Baleares, 1–32.

EPA. (1986). METHOD 8100 POLYNUCLEAR AROMATIC HYDROCARBONS, (September), 1–10.

Evans, L. (2018). Bioremediation Techniques for Agricultural Pollutants. *Earth Systems and Environmental Sciences*, 1–5. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11259-X

FAO. (2018). Concept Note. Global symposium on Soil Pollution (GSOP18)., 0–16. Retrieved from http://www.fao.org/3/I8411EN/i8411en.pdf

Fauzul, M., Budi, S., & Slistiyaning, H. (2019). Potential of bacteria isolated from diesel-contaminated seawater in diesel biodegradation. *Environmental Technology & Innovation*, *14*, 100368. https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100368

Fernández, L. C., Rojas, N. G., Roldán, T. G., Ramírez, M. E., Zegarra, H. G., Uribe, R., … Arce, J. M. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos.

García, E., Roldán, F., & Garzón, L. (2011). Evaluation of Biostimulation (Nutrients) in Hydrocarbons Contaminated Soils by Respirometry.

Gavillanes, R. A. (2013). *DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN SUELOS CONTAMINADOS POR LA INDUSTRIA PETROLERA*. Universidad Central del Ecuador.

Groysman, A. (2014). *Corrosion in Systems for Starage and Transportation of Petroleum Products and Biofuels*. New York: Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7884-9

Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, *169*, 1–15. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137

Huamán, G. A. (2016). *TOXICIDAD DEL EFLUENTE DE LA LAGUNA DE ESTABILIZACIÓN EL ESPINAR MEDIANTE BIOENSAYOS CON Daphnia pulex y Lactuca sativa L*. Universidad Nacional Agraria La Molina.

Infante, C., & Morales, F. A. (2012). Evaluación de la Toxicidad en Desechos y Suelos Petrolizados empleando semillas de Lactuca sativa L. *Interciencia*, *37*(10), 782–788.

Infante, C., Ortega, C., Morales, F., Ehrmann, U., Hernandez-valencia, I., & Pérez, R. (2010). Effects of potassium on the bioremediation of a soil contaminated with medium crude oil., *22*(2), 145–152.

Izquierdo Romero, A. R. (2013). *Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo . Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales*. Universitat de Barcelona.

Jiménez, D., Medina, S. A., & Gracida, J. N. (2010). PROPIEDADES, APLICACIONES Y PRODUCCIÓN DE BIOTENSOACTIVOS. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, *26*(1), 65–84.

Juwarkar, A. A., & Singh, S. K. (2010). A comprehensive overview of elements in bioremediation, 215–288. https://doi.org/10.1007/s11157-010-9215-6

Kastner, M. (2008). Degradation of Aromatic and Polyaromatic Compounds, 211–239. https://doi.org/10.1002/9783527620951.ch9

Khan, M., Biswas, B., Smith, E., Naidu, R., & Megharaj, M. (2018). Chemosphere Toxicity

assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil- a review. *Chemosphere*, *212*, 755–767. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.094

Khayati, G., & Barati, M. (2017). Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soil : Optimization Strategy Using Taguchi Design of Experimental (DOE) Methodology. *Springer*, *4*(2), 451–461. https://doi.org/10.1007/s40710-017-0244-9

Kuppusamy, S., Palanisami, T., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2016). *Ex-Situ Remediation Technologies for Environmental Pollutants : A Critical Perspective* (Vol. 236). https://doi.org/10.1007/978-3-319-20013-2

Lallana, M. C., Elizalde, J. H., Lallana, V. H., & Billard, C. E. (2008). Germination bioassay of Lactuca sativa (L.): to determine water quality in irrigation dams. *Revista UNCuyo*, (3101), 29–38.

Lee, M., kim, J., & Kim, I. (2011). In-situ biosurfactant flushing, coupled with a highly pressurized air injection, to remediate the bunker oil contaminated site, *15*(3), 313–321. https://doi.org/10.1007/s12303-011-0029-5

Leys, N. M., Bastiaens, L., & Verstraete, W. (2005). Influence of the carbon / nitrogen / phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by Mycobacterium and Sphingomonas in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *66*(6), 726–736. https://doi.org/10.1007/s00253-004-1766-4

Li, X., Chang, S. X., Liu, J., Zheng, Z., & Wang, X. (2017). Topography-soil relationships in a hilly evergreen broadleaf forest in subtropical China, 1101–1115. https://doi.org/10.1007/s11368-016-1573-4

Li, Y., Liu, Y., Jiang, D., Xu, J., Zhao, X., & Hou, Y. (2018). Effects of weathering process on the stable carbon isotope compositions of polycyclic aromatic hydrocarbons of fuel oils and crude oils. *Marine Pollution Bulletin*, *133*, 852–860. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.06.038

Liu, Qianjun, Tang, J., Chen, D., Zhou, Y., Lin, Q., Ma, X., … Hu, H. (2019). [Hmim] PF 6 enhanced the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil with the QuEChERS method. *Arabian Journal of Chemistry*. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2019.06.009

Liu, Qingmei, Li, Q., Wang, N., Liu, D., Zan, L., Chang, L., … Wang, P. (2018). Bioremediation of petroleum-contaminated soil using aged refuse from landfills. *Waste Management*. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.05.010

Maestroni, B., Ferris, I. G., Correll, R., Kohlmann, B., Nordgaard, A., Kookana, R. S., & Cannavan, A. (2018). *Generic Guidelines on Integrated Analytical Approaches to Assess Indicators of Pesticide Management Practices at a Catchment Scale . Black-Box Monitoring and the Laboratory ' s Role in Fostering Good Agricultural Practice*. *Integrated Analytical Approaches for Pesticide Management*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816155-5.00002-6

Maheshwari, A., & Gulati, S. (2018). Kerosene poisoning. *JIndian Journal of Medical Specialities*, 5–8. https://doi.org/10.1016/j.injms.2018.06.009

Maila, M. P., & Cloete, T. E. (2005). Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming : Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages ?, (2004), 349–360. https://doi.org/10.1007/s11157-004-6653-z

Martínes, L. M., Lo Balbo, A., Mac Cormack, W. P., & Ruberto, L. A. M. (2015). Bioremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated Antarctic soil: Optimization of a biostimulation strategy using response-surface methodology (RSM). *Cold Regions Science and Technology*, (119), 61–67. https://doi.org/10.1016/j.coldregions.2015.07.005

Martínez, A., Pérez, E., Pinto, J., Gurrolla, B., & Osorio, L. (2011). Biorremediacion de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes, *27*(3), 241–252.

Martínez Álvarez, L. M., Ruberto, L. A. M., Lo Balboa, A., & Cormackwp, M. (2017). Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils in cold regions : Development of a pre-optimized biostimulation biopile-scale fi eld assay in Antarctica. *Science of the Total Environmen*, 194–203. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.204

Matchavariani, L. (2019). *Soil-Forming Factors*. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18509-1

Maurice, L., López, F., Becerra, S., Jamhoury, H., Le, K., Dévier, M., … Schreck, E. (2019). Drinking water quality in areas impacted by oil activities in Ecuador : Associated health risks and social perception of human exposure. *Science of the Total Environment*, *690*, 1203–1217. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.089

Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., & Naidu, R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants : A critical perspective. *Environment International*, *37*(8), 1362–1375. https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.06.003

Meng, Y., Liu, X., Lu, S., Zhang, T., Jin, B., Wang, Q., … Xi, B. (2019). A review on occurrence and risk of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in lakes of China. *Science of the Total Environment*, *651*, 2497–2506. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.162

Miles, B., Maji, R., Sudicky, E. A., Teutsch, G., & Peter, A. (2008). A pragmatic approach for estimation of source-zone emissions at LNAPL contaminated sites, *96*, 83–96. https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2007.10.003

Mohan, S. V., Kisa, T., Ohkuma, T., Kanaly, R. A., & Shimizu, Y. (2006). Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency, 347–374. https://doi.org/10.1007/s11157-006-0004-1

Morales, F., Ehrmann, U., & Pernía, B. (2014). *Remediation of Soils Impacted with Heavy and Weathered Crude Oil: The Venezuelan Experience*.

Moscoso, R. V. (2014). *Determinación de la toxicidad por aluminio del efluente de la Planta Potabilizadora de El Cebollar en el Río Tomebamba, utilizando bioensayos ecotoxicológicos*. Universidad de Cuenca.

Naseri, M., Barabadi, A., & Barabady, J. (2014). Bioremediation treatment of hydrocarbon-contaminated Arctic soils : influencing parameters. https://doi.org/10.1007/s11356-014-3122-2

Nzila, A. (2018). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons under anaerobic conditions : Overview of studies , proposed pathways and future perspectives *. *Environmental Pollution*, *239*, 788–802. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.074

O´Sullivan, L., Mcconnell, B., Scanlon, R., Walsh, S., & Creamer, R. (2018). Soil Formation, 11–37.

Ortínez, O., Lema, I., & Gavilán, A. (2003). La restauración de suelos La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México, 11. Retrieved from https://www.redalyc.org/pdf/539/53906906.pdf?fbclid=IwAR1Bd2VuEy-Dqhb7cglh1u1kBvAwiZuln6hTwXWajADm16TKZ9u_6h__eCU

Osman, K. T. (2013). Factors and Processes of Soil Formation 3, 17–30. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5663-2

Otiniano-García, N. M. (2004). Efecto de la fuente nitrogenada sobre la capacidad de degradación del petróleo diesel 2 por Pseudomonas sp

Patowary, R., Patowary, K., & Devi, A. (2016). Uptake of Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) by Oryza sativa L . Grown in Soil Contaminated with Crude Oil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *0*(0), 0. https://doi.org/10.1007/s00128-016-1990-5

Pernía, B., Rojas-Tortolero, D., Sena, L., De Sisto, A., Inojosa, Y., & Naranjo, L. (2018). Fitotoxicidad de HAPs, crudos extra pesados y sus fracciones en Lactuca sativa: Una interprestación integral utilizado un índice de toxicidad modificado. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, *34*(1), 79–91. https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.01.07

Petruzzelli, G., Pedron, F., Rosellini, I., Grifoni, M., & Barbafieri, M. (2016). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Heavy Metal Contaminated Sites : Phytoremediation as a Strategy for Addressing the Complexity of Pollution, 61–90. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41811-7

Philp, J. C., & Atlas, R. M. (2016). *SOILS AND AQUIFERS*.

Pino, N., Carvajal, S., Gallo, A., & Peñuela, G. (2012). Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con diesel *, *7*(1), 101–108.

Ponce, D. S. (2014). *Biorremediacion de suelos contaminados con hidrocarburos*. Universidad del Bio-Bio.

Prince, R., Varadara, R., Fiocco, R., & Lessard, R. (1999). Bioremediation as an oil spill response tool, *20*, 891–896. https://doi.org/https://doi.org/10.1080/09593332008616884

Quintella, C. M., Mata, A. M. T., & Lima, L. C. P. (2019). Overview of bioremediation with technology assessment and emphasis on fungal bioremediation of oil contaminated soils. *Journal of Environmental Management*, *241*(March), 156–166. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.019

Ramadan, B. S., Sari, G. L., Rosmalina, R. T., & Effendi, A. J. (2018). An overview of electrokinetic soil flushing and its effect on bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Environmental Management*, *218*, 309–321. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.065

RAOHE. (2010). Reglamento ambiental de actividades hidrocarburiferas.

Redfern, L. K., Gardner, C. M., Hodzic, E., Ferguson, P. L., Hsu-kim, H., & Gunsch, C. K. (2019). A new framework for approaching precision bioremediation of PAH contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, (September 2018), 120859. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120859

Redfern, L. K., Gardner, C. M., Hodzic, E., Lee, P., Hsu-kim, H., & Gunsch, C. K. (2019). A new framework for approaching precision bioremediation of PAH contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, (September 2018), 120859. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120859

Rivera, P., Rivera, J., Andrade, E., Heyer, L., De La Garza, F., & Castro, B. (2018). BIOESTIMULACIÓN Y BIORREMEDIACIÓN DE RECORTES DE PERFORACIÓN CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS, *34*(2), 249–262. https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.02.06

Rodríguez, A. j, Robles, C. A., Ruíz, R. A., López, E., Elias, J., Sedeño, J. E., & Rodríguez, A. (2014). Índices de germinación y elongación radical de, *30*(3), 307–316.

Sakshi, Singh, S. ., & Haritash, A. . (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons : soil pollution and remediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, (0123456789). https://doi.org/10.1007/s13762-019-02414-3

Sayara, T., Borràs, E., Caminal, G., Sarrà, M., & Sánchez, A. (2011). Biodeterioration & Biodegradation Bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting : In fl uence

of bioaugmentation and biostimulation on contaminant biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *65*(6), 859–865. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.05.006

Seminoti, R., Menezes, F., Antoniolli, Z., & De Oliveira, F. (2007). Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, 1192–1201.

Shahsavari, E., Schwarz, A., Aburto-medina, A., & Ball, A. S. (2019). Biological Degradation of Polycyclic Aromatic Compounds (PAHs) in Soil : a Current Perspective, 84–92.

Shukla, A., Panchal, H., Mishra, M., Patel, P., Srivastava, H. S., Patel, P., & Shukla, A. . (2014). Soil Moisture Estimation using Gravimetric Technique and FDR Probe Technique : A Comparative Analysis. *American International Journal of Research in Formal, Applied & Natural Sciences*, *14*, 89–92.

Sihag, S., Pathak, H., & Jarol, D. p. (2014). Factors Affecting the Rate of Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons, *2*(3), 185–202.

Sobrero, M. C., & Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga Lactuca sativa L ., 55–68.

Speight, J. G., & El-Gendy, N. S. (2018). *Bioremediation of contaminated soil*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805151-1.00010-2

Speight, J., & Shafik, N. (2018). *Petroleum composition and properties*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805151-1.00001-1

Suja, F., Rahim, F., Taha, M. R., Hambali, N., Razali, M. R., Khalid, A., & Hamzah, A. (2014). Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and fi eld observations. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *90*, 115–122. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.03.006

Synák, F., Čulík, K., Rievaj, V., & Gaňa, J. (2019). Liquefied petroleum gas a as an alternative. *ScienceDirect*, *40*, 527–534. https://doi.org/10.1016/j.trpro.2019.07.076

Tabak, H. H., Lens, P., van Hullebusch, E. D., & Dejonghe, W. (2005). Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides – 1 . Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport, 115–156. https://doi.org/10.1007/s11157-005-2169-4

Tomei, M. C., & Daugulis, A. J. (2014). Ex Situ Bioremediation of Contaminated Soils : An Overview of Conventional and Innovative Technologies, *43*(20), 37–41. https://doi.org/10.1080/10643389.2012.672056

Torri, S., Cabrera, M., & Alberti, C. (2018). RESPIRACIÓN POTENCIAL DURANTE LA BIOESTIMULACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS, *34*(1), 127–136. https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.01.11

Tran, T. H., Gati, E. M., Eshel, A., & Winters, G. (2018). Germination , physiological and biochemical responses of acacia seedlings (Acacia raddiana and Acacia tortilis) to petroleum contaminated soils *. *Environmental Pollution*, *234*, 642–655. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.067

TULSMA. (2014). NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL DEL RECURSO SUELO Y CRITERIOS DE REMEDIACIÓN PARA SUELOS CONTAMINADOS.

Valerio, M. E., García, J. F., & Peinado, F. M. (2007). Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils , based on a bioassay with lettuce (Lactuca sativa L .), *378*, 63–66. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.01.007

Vallejo, V. E., Sandoval, J. J., Garagoa, S. C., & Bastos, J. (2016). Evaluation of the biostimulation over the bioremediation of hydrocarbons in contaminated soils with tar in Soacha, Cundinamarca- Colombia, *65*(4), 354–361. https://doi.org/https://doi.org/10.15446/acag.v65n4.51013

Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2017). A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *120*, 71–83. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.02.006

Varjani, S., & Upasani, V. N. (2019). In fl uence of abiotic factors , natural attenuation , bioaugmentation and nutrient supplementation on bioremediation of petroleum crude contaminated agricultural soil. *Journal of Environmental Management*, *245*(March), 358–366. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.070

Walters, C. C. (2017). Origin of Petr, 359–379. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49347-3

Wilson, M. J. (2019). The importance of parent material in soil classification: A review in a historical context. *Catena*, *182*(March), 104131. https://doi.org/10.1016/j.catena.2019.104131

Wu, M., Wu, J., Zhang, X., & Ye, X. (2019). Effect of bioaugmentation and biostimulation on hydrocarbon degradation and microbial community composition in petroleum-contaminated loessal soil. *Chemosphere*. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124456

Yassoglou, N., Tsadilas, C., & Kosmas, C. (2017). Soil-Forming Factors, (1938), 7–17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53334-6

Yu, G., Zhang, Z., Yang, G., Zheng, W., Xu, L., & Cai, Z. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons in urban soils of Hangzhou : status , distribution , sources , and potential risk. https://doi.org/10.1007/s10661-013-3578-4

Yu, L., Wang, S., Wang, W., Qiu, Y., Qian, Y., Mao, Y., & Lu, X. (2019). Exploration of chemical composition effects on the autoignition of two commercial diesels : Rapid compression machine experiments and model simulation. *Combustion and Flame*, *204*, 204–219. https://doi.org/10.1016/j.combustflame.2019.03.007

ANEXOS

ANEXO 1: Resultados del análisis de carbono y nitrógeno realizados por Seidlaboratory

SEIDLABORATORY CÍA. LTDA.
SERVICIO INTEGRAL DE LABORATORIO
www.seidlaboratory.com.ec

INFORME DE ENSAYO NR. 189415

INFORMACION PROPORCIONADA POR EL CLIENTE			
CLIENTE:	ROSALÍA SARMIENTO SARMIENTO		
DIRECCION:	CUENCA		
TIPO DE MUESTRA:	SUELO - MUESTRA 2		
TIPO DE PRODUCTO:	SUELO - MUESTRA 2		
FECHA DE ELABORACION:	ND	*FECHA DE CADUCIDAD:*	ND
LOTE:	ND	*CONTENIDO DECLARADO:*	244 g
MATERIAL DE ENVASE:	FUNDA ZIPLOC CERRADA	*FORMA DE CONSERVACIÓN:*	AMBIENTE

INFORMACION DE LA MUESTRA			
CODIGO LABORATORIO:	189415 -1	*CONTENIDO ENCONTRADO:*	NS
FECHA RECEPCION:	19/08/08	*FECHA INICIO ENSAYO:*	19/08/08
CONDICIONES AMBIENTALES DE LLEGADA DE LA MUESTRA:	Temperatura 21ºC	*MUESTREO: Es responsabilidad del cliente y, los resultados aplican a la muestra entregada por el cliente tal como se recibió*	

ENSAYOS FISICO QUIMICOS	METODO	UNIDAD	RESULTADO
Carbono*	Real Decreto 11081991 Walkley & Black (Volumetria)	%	1,24
Nitrógeno	M. INTERNO	%	0,217

SEIDLABORATORY CÍA. LTDA.
SERVICIO INTEGRAL DE LABORATORIO
www.seidlaboratory.com.ec

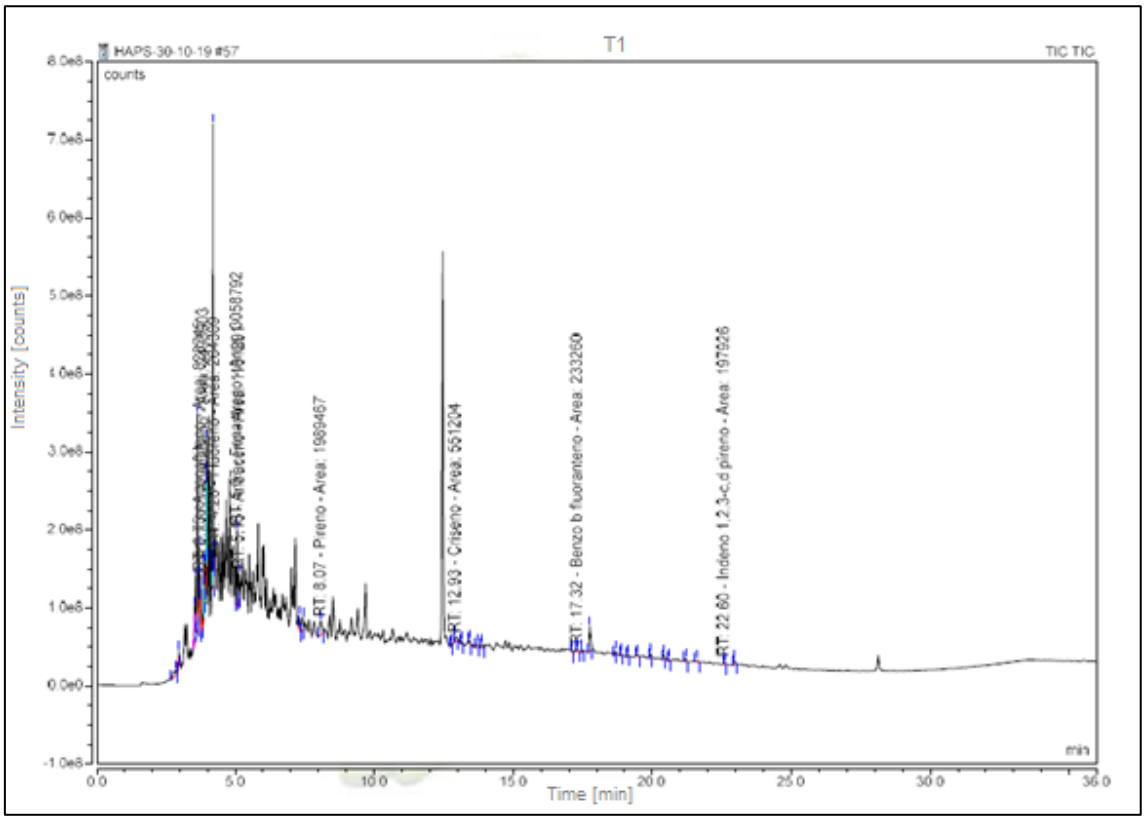
INFORME DE ENSAYO NR. 189414

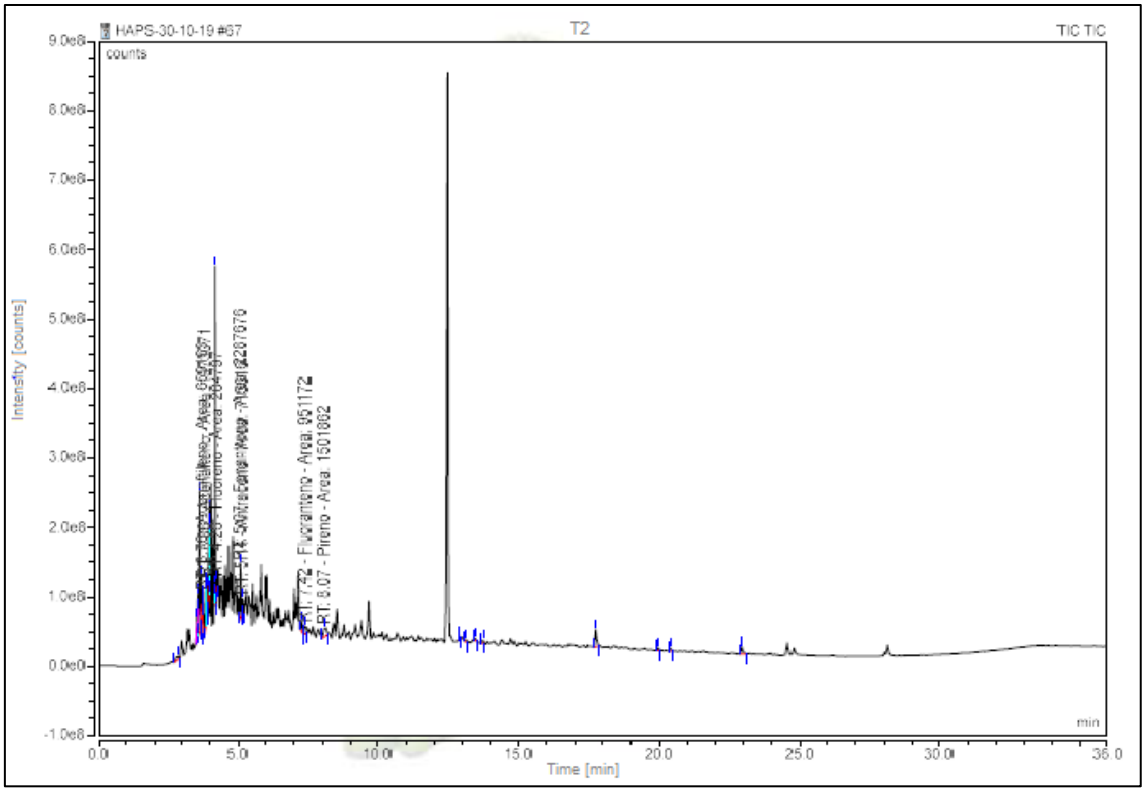
INFORMACION PROPORCIONADA POR EL CLIENTE			
CLIENTE:	**ROSALÍA SARMIENTO SARMIENTO**		
DIRECCION:	CUENCA		
TIPO DE MUESTRA:	SUELO - MUESTRA 1		
TIPO DE PRODUCTO:	SUELO - MUESTRA 1		
FECHA DE ELABORACION:	ND	***FECHA DE CADUCIDAD:***	ND
LOTE:	ND	***CONTENIDO DECLARADO:***	ND
MATERIAL DE ENVASE:	FUNDA ZIPLOC CERRADA	***FORMA DE CONSERVACIÓN:***	AMBIENTE

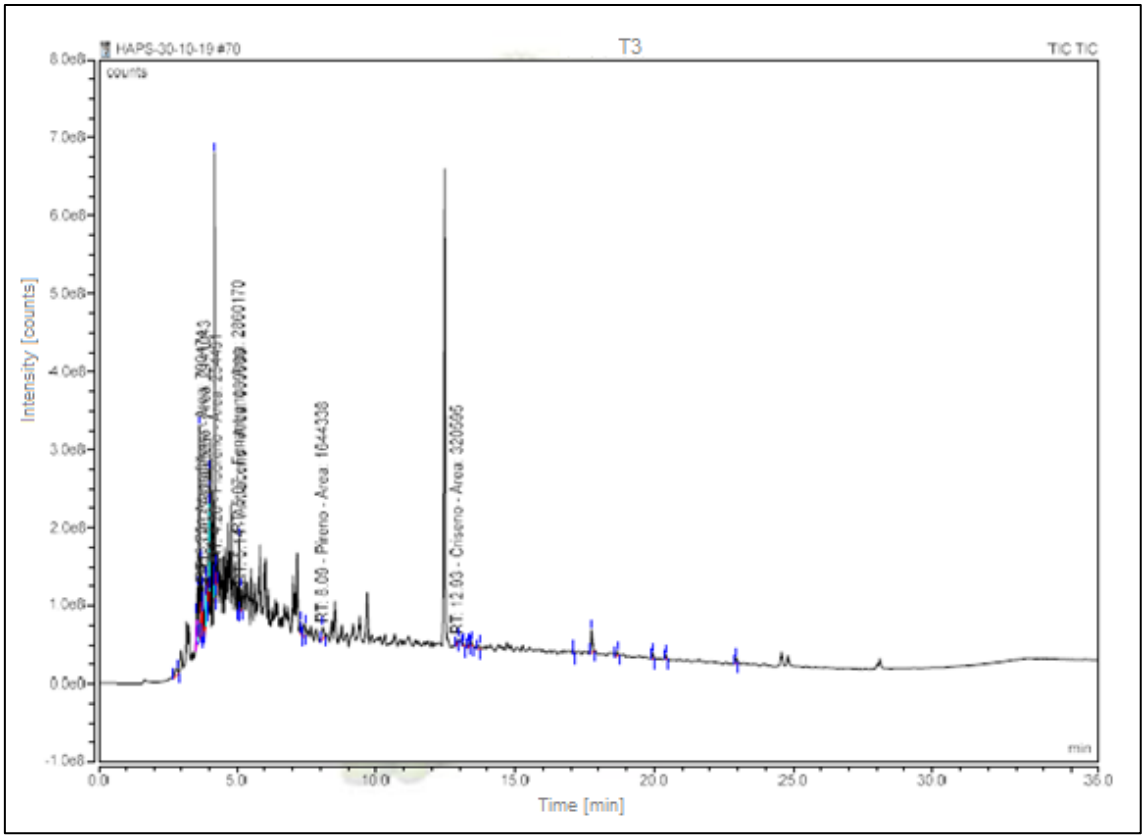
INFORMACION DE LA MUESTRA			
CODIGO LABORATORIO:	189414 -1	***CONTENIDO ENCONTRADO:***	245,5 g
FECHA RECEPCION:	19/08/08	***FECHA INICIO ENSAYO:***	19/08/08
CONDICIONES AMBIENTALES DE LLEGADA DE LA MUESTRA:	Temperatura 21ºC	***MUESTREO:*** *Es responsabilidad del cliente y, los resultados aplican a la muestra entregada por el cliente tal como se recibió*	

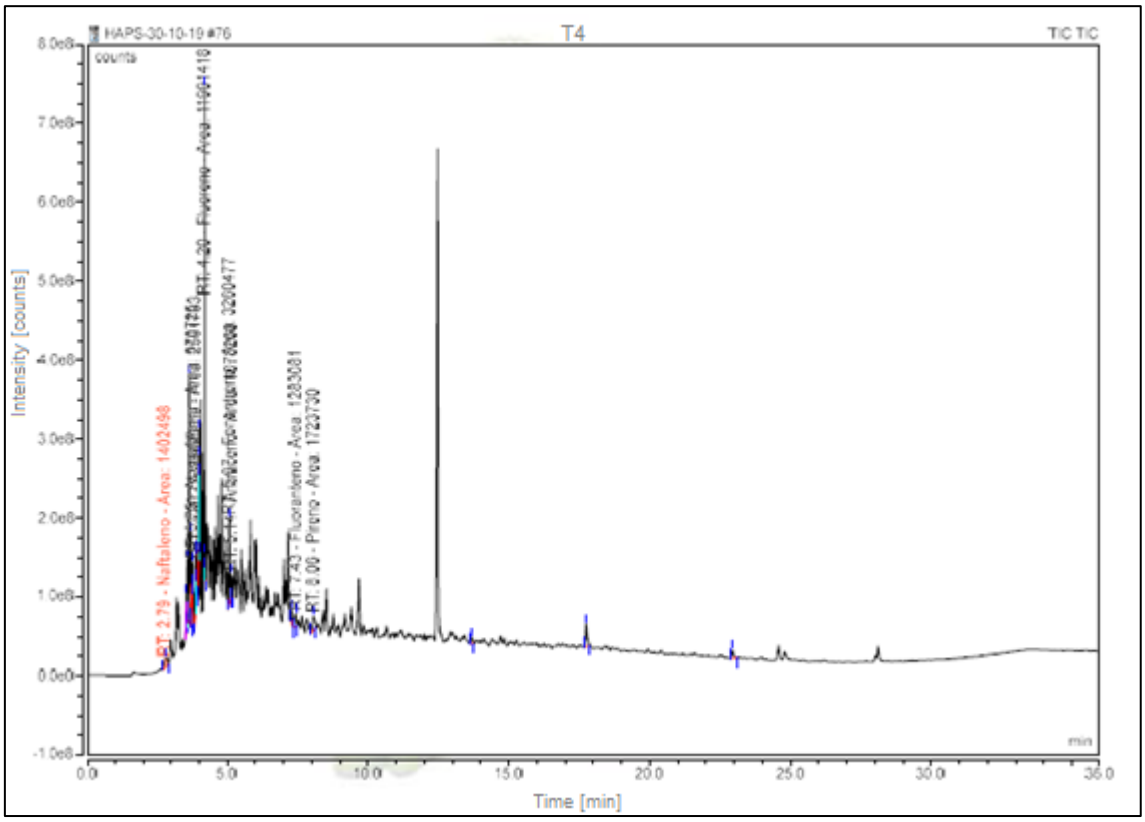
ENSAYOS FISICO QUIMICOS	METODO	UNIDAD	RESULTADO
Carbono*	Real Decreto 11081991 Walkley & Black (Volumetria)	%	1,32
Nitrógeno	M. INTERNO	%	0,249

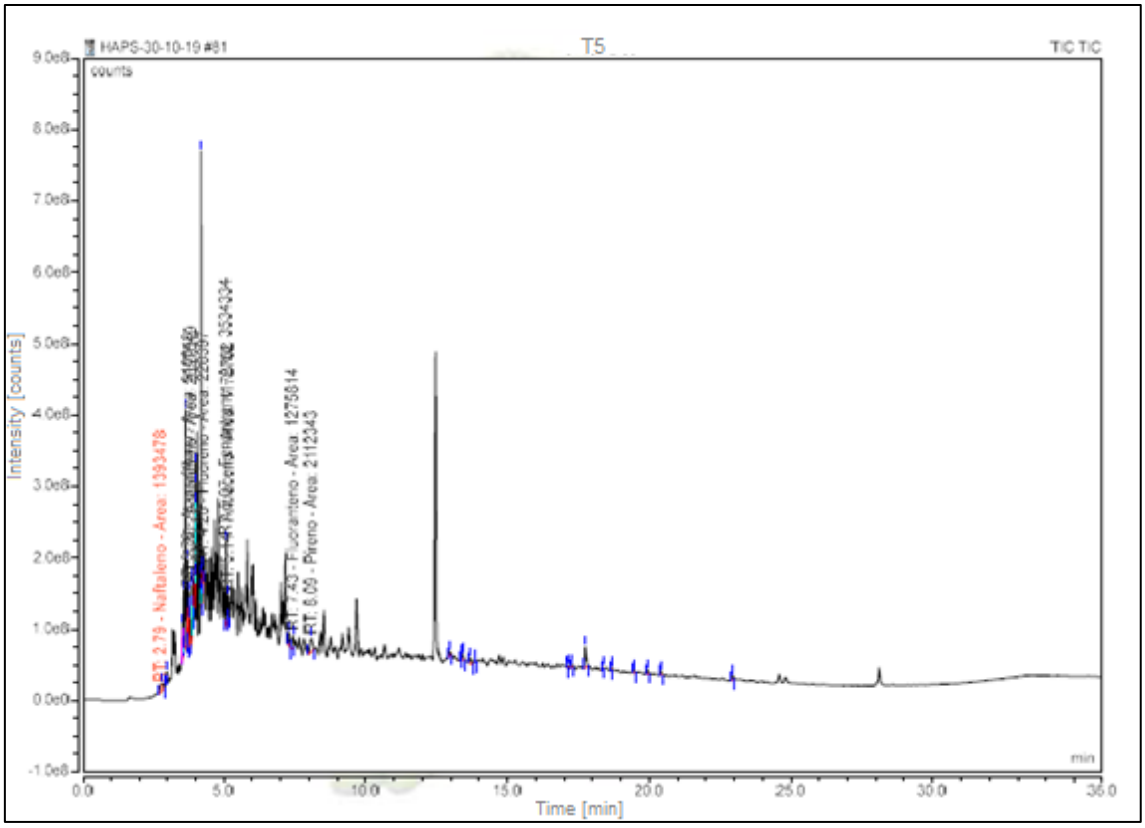
Anexo 2: Cromatogramas de todos los experimento transcurrido los 15 días de experimentación

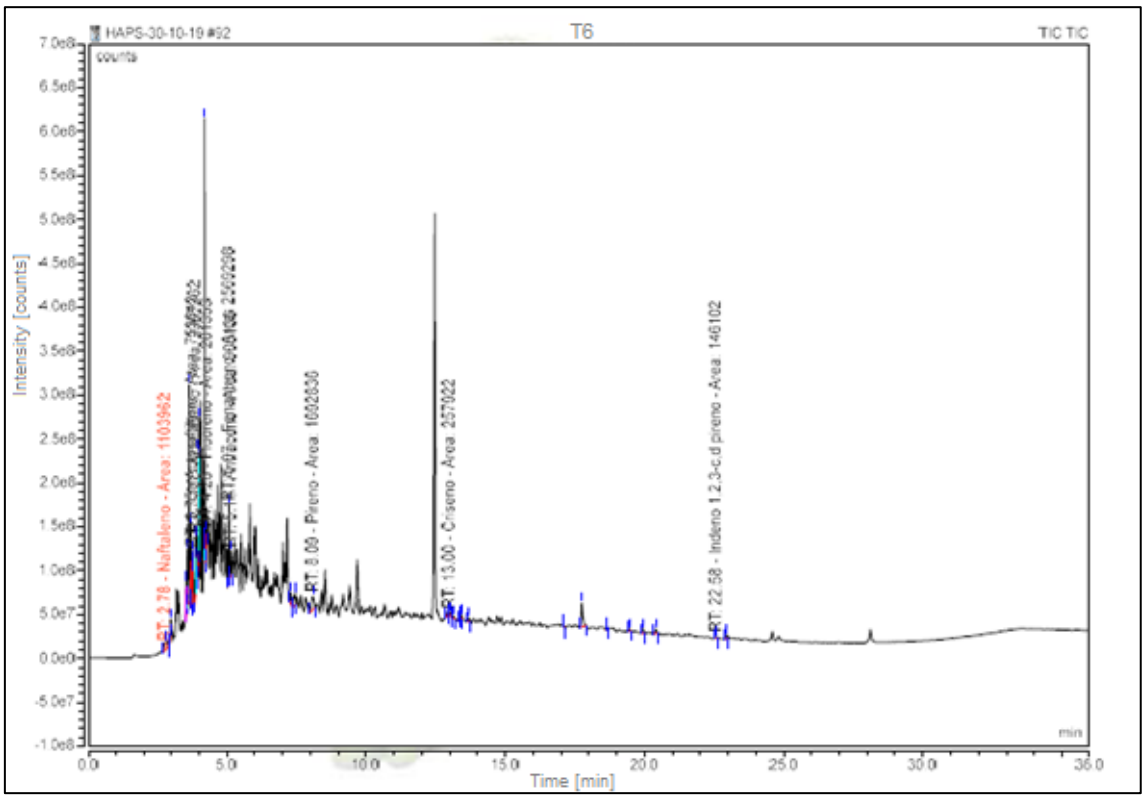



HAPS-30-10-19 #67
T2
TIC TIC
counts
Intensity [counts]
9.0e8
8.0e8
7.0e8
6.0e8
5.0e8
4.0e8
3.0e8
2.0e8
1.0e8
0.0e0
-1.0e8
RT: 7.42 - Fluoranteno - Area: 951172
RT: 8.07 - Pireno - Area: 1501862
min
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
Time [min]

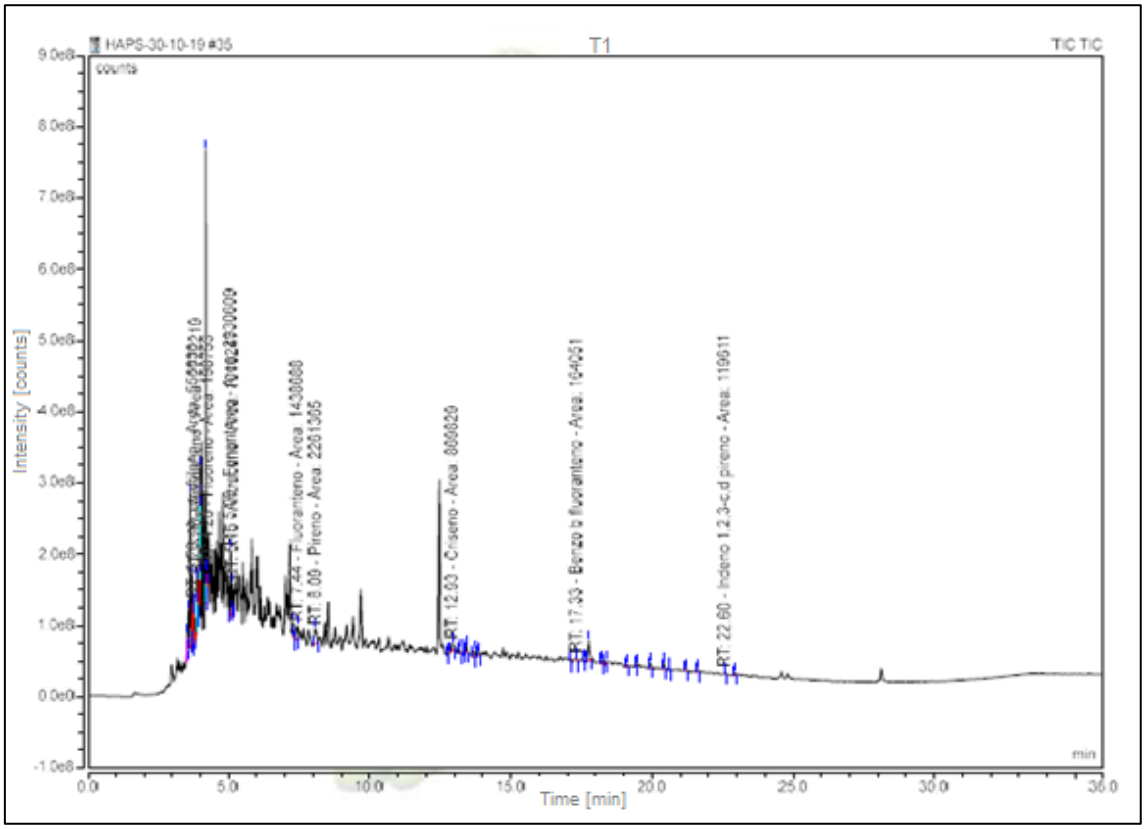

T3
HAPS-30-10-19 #70
TIC TIC
counts
Intensity [counts]
RT: 8.00 - Pireno - Area: 1644338
RT: 12.03 - Criseno - Area: 320565
min
Time [min]

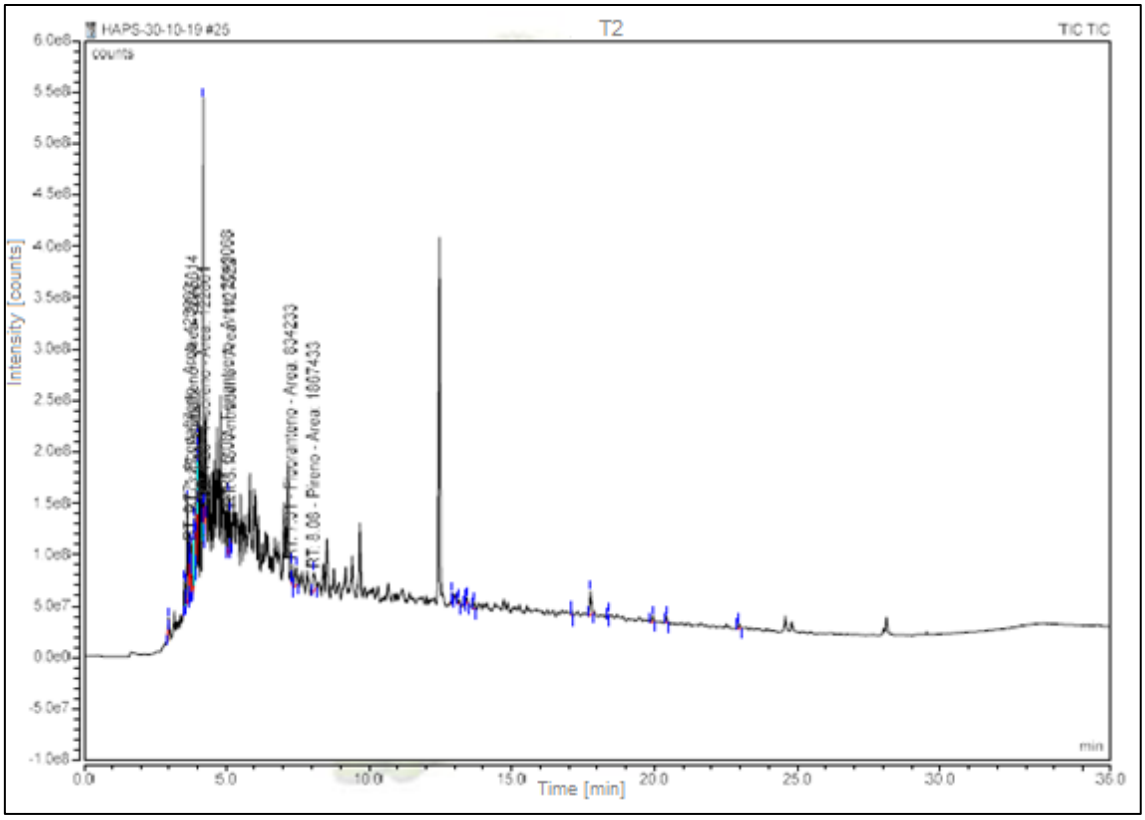

T4
HAPS-30-10-19 #76
TIC TIC
counts
Intensity [counts]
RT: 2.73 - Naftaleno - Area: 1402468
RT: 7.43 - Fluoranteno - Area: 1283081
RT: 8.00 - Pireno - Area: 1723730
min
Time [min]

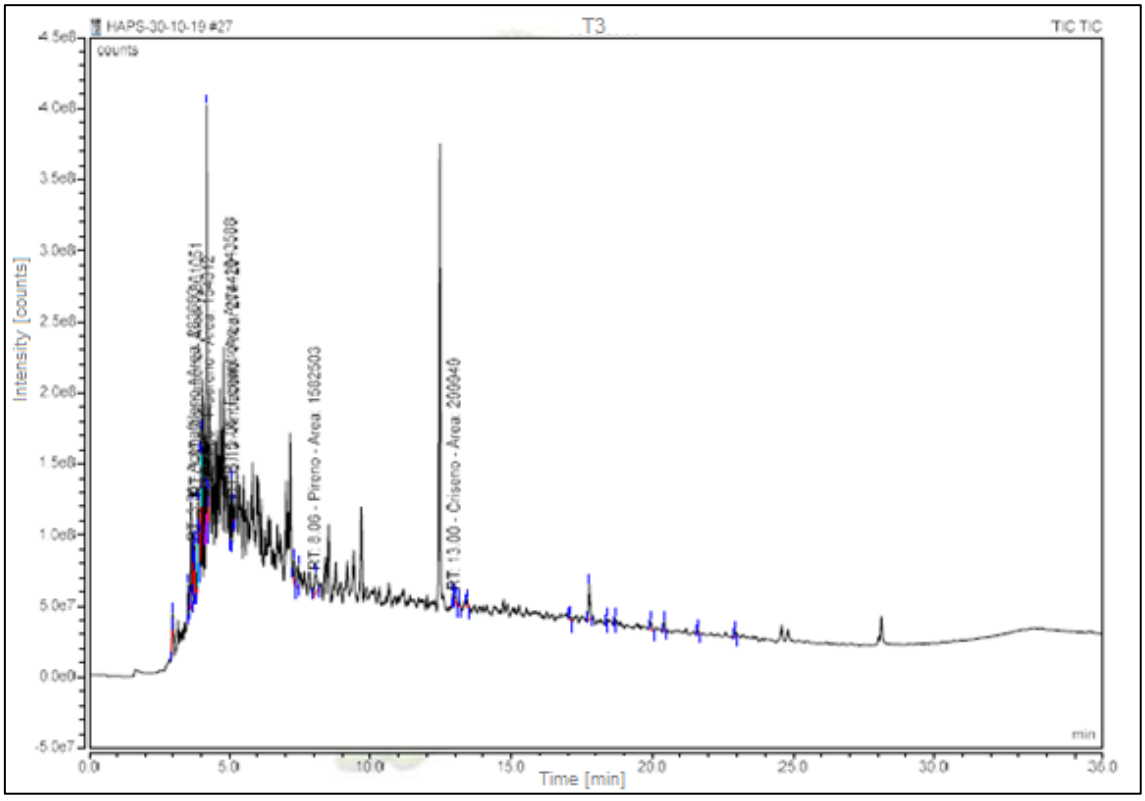

HAPS-30-10-19 #81
T5
TIC TIC
counts
Intensity [counts]
RT: 2.79 - Naftaleno - Area: 1393478
RT: 7.43 - Fluoranteno - Area: 1275814
RT: 8.09 - Pireno - Area: 211243
min
Time [min]

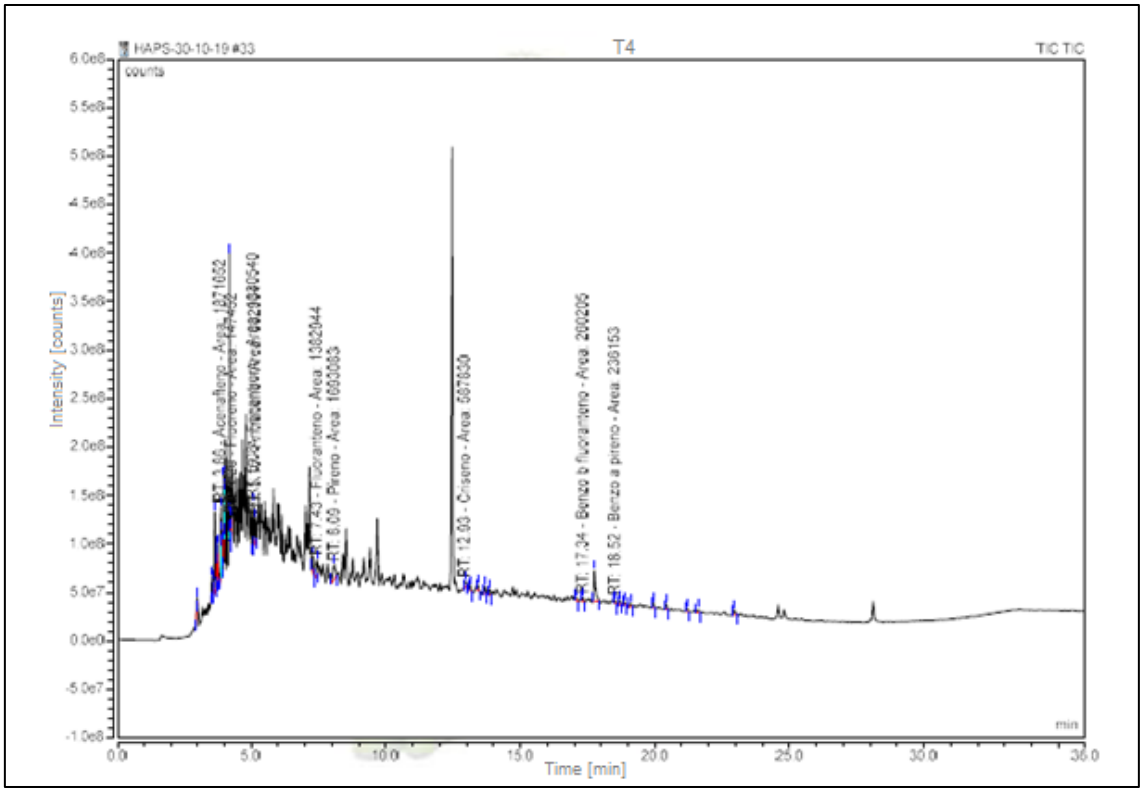

HAPS-30-10-19 #82
T6
TIC TIC
counts
Intensity [counts]
RT: 2.78 - Naftaleno - Area: 1103962
RT: 8.09 - Pireno - Area: 1002830
RT: 13.00 - Criseno - Area: 257022
RT: 22.58 - Indeno 1,2,3-c,d pireno - Area: 146102
min
Time [min]

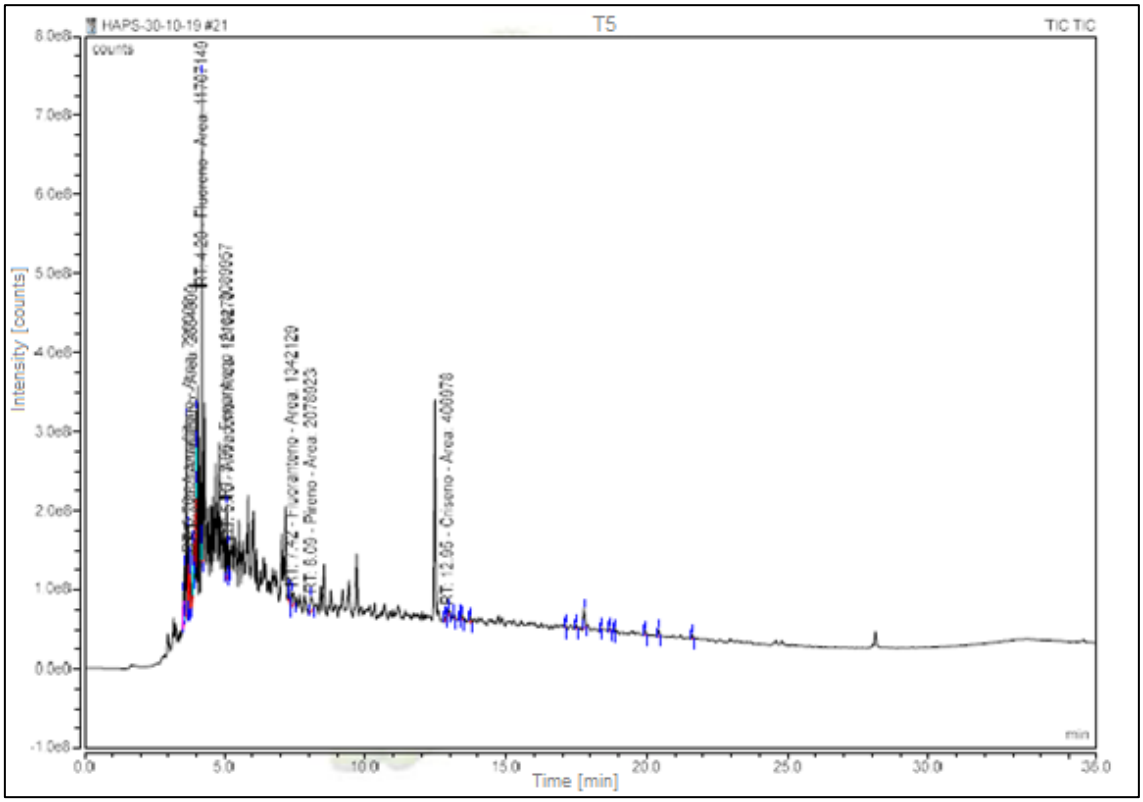
Anexo 3: Cromatogramas de todos los experimento transcurrido los 30 días de experimentación

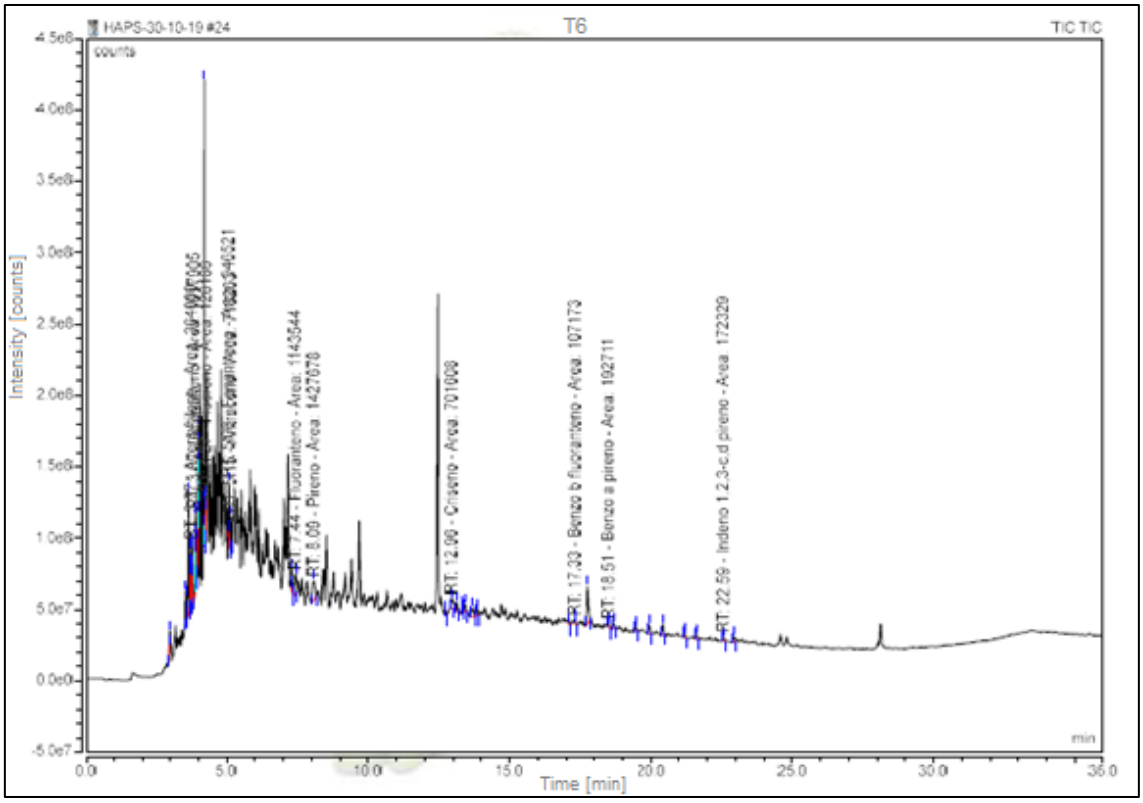



HAPS-30-10-19 #25
T2
TIC TIC
counts
Intensity [counts]
RT 8.08 - Pireno - Area 1607433
Time [min]
min

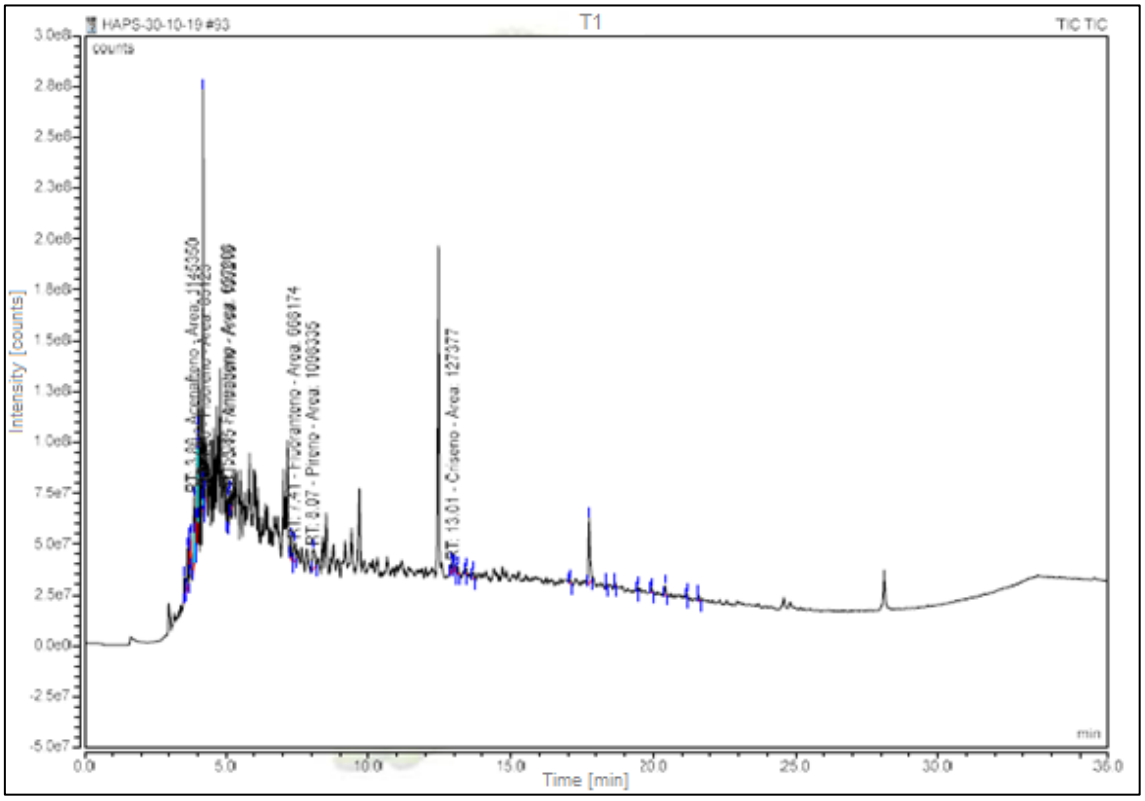

HAPS-30-10-19 #27
T3
TIC TIC
counts
Intensity [counts]
RT 8.06 - Pireno - Area 1582503
RT 13.00 - Criseno - Area 200940
Time [min]
min

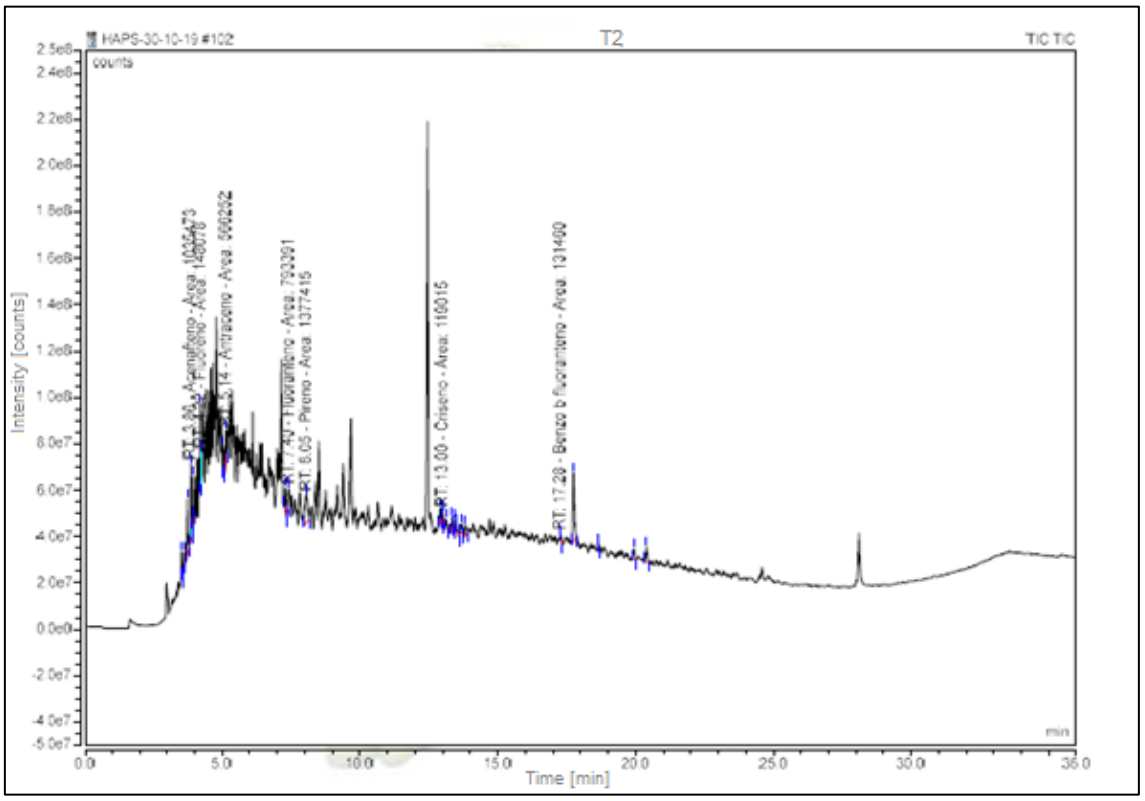

HAPS-30-10-19 #33
T4
TIC TIC
counts
Intensity [counts]
Time [min]
min
RT: 4.20 - Fluoranteno - Area: 1382044
RT: 6.09 - Pireno - Area: 1693063
RT: 12.03 - Criseno - Area: 587630
RT: 17.34 - Benzo b fluoranteno - Area: 260205
RT: 18.52 - Benzo a pireno - Area: 236153

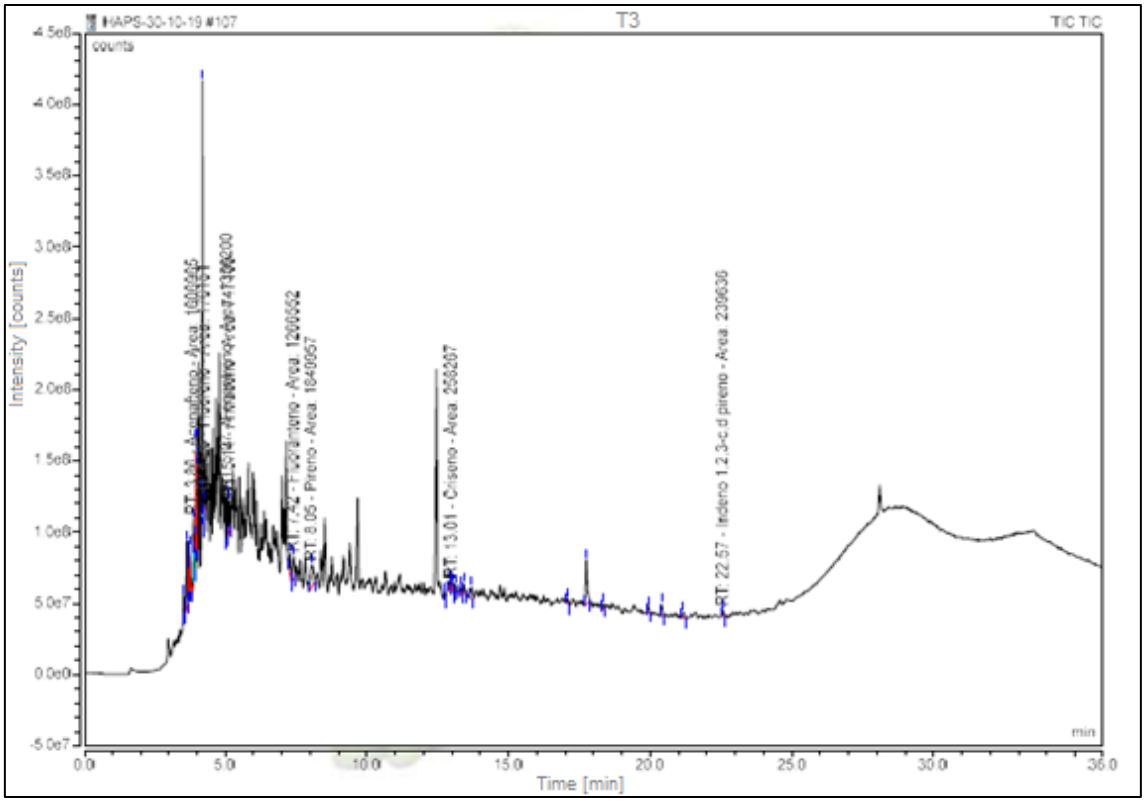

HAPS-30-10-19 #21
T5
TIC TIC
counts
Intensity [counts]
Time [min]
min
RT: 4.20 - Fluoreno - Area: 1176140
RT: 7.42 - Fluoranteno - Area: 1242129
RT: 8.09 - Pireno - Area: 2078023
RT: 12.95 - Criseno - Area: 400078

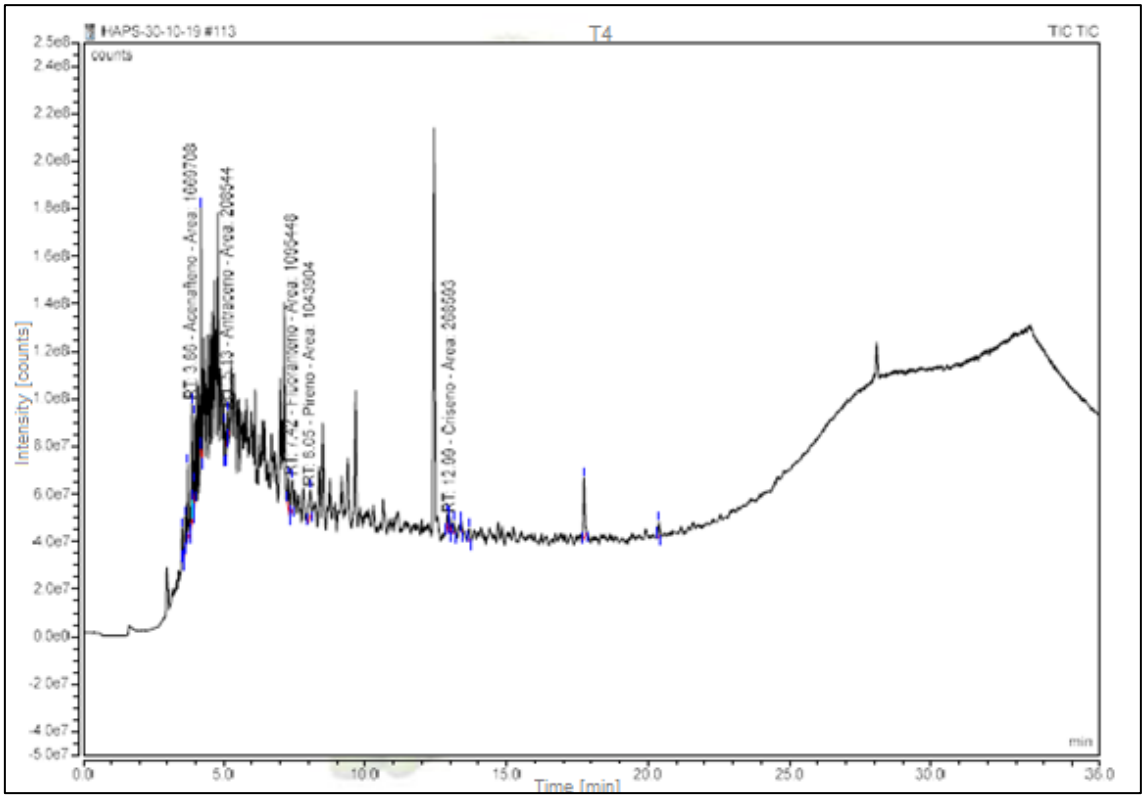

HAPS-30-10-19 #24
T6
TIC TIC
counts
Intensity [counts]
4.5e8
4.0e8
3.5e8
3.0e8
2.5e8
2.0e8
1.5e8
1.0e8
5.0e7
0.0e0
-5.0e7
RT: 7.44 - Fluoranteno - Area: 1143544
RT: 8.09 - Pireno - Area: 1427676
RT: 12.09 - Criseno - Area: 701008
RT: 17.33 - Benzo b fluoranteno - Area: 107173
RT: 18.51 - Benzo a pireno - Area: 192711
RT: 22.59 - Indeno 1,2,3-c,d pireno - Area: 172329
min
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
Time [min]

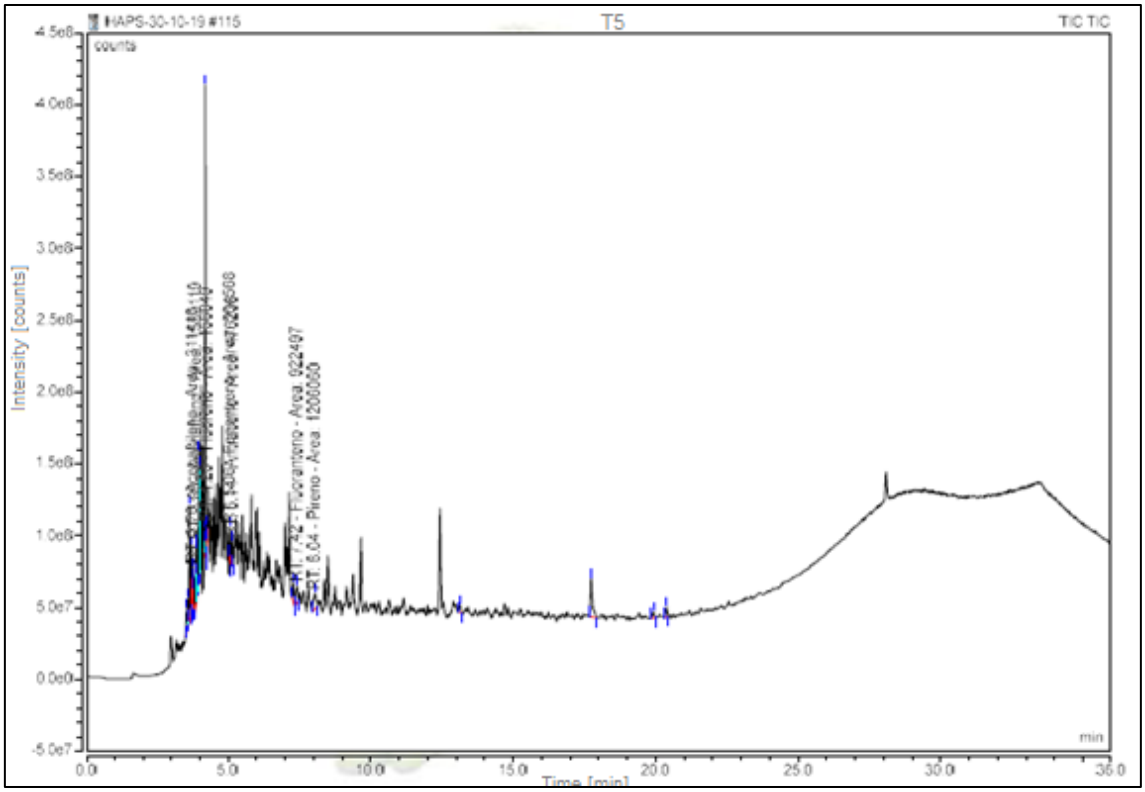
Anexo 4: Cromatogramas de todos los experimento transcurrido los 60 días de experimentación

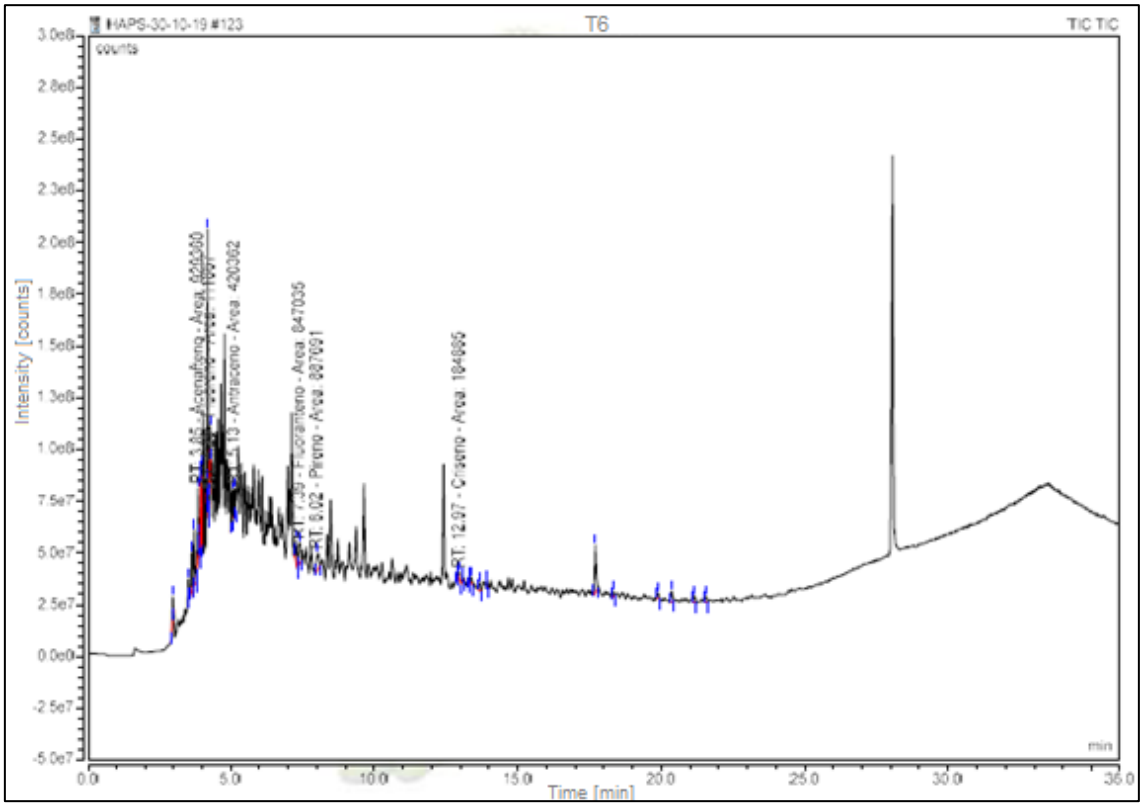




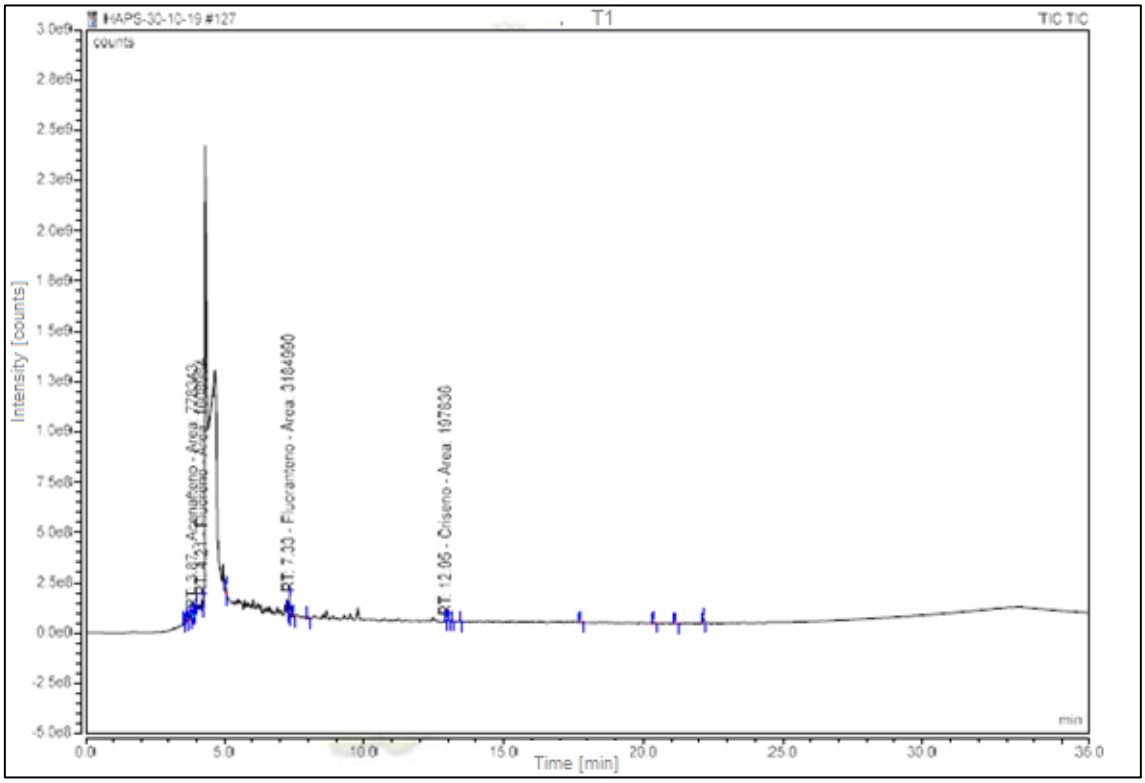

HAPS-30-10-19 #107
T3
TIC TIC
counts
Intensity [counts]
Time [min]
min
RT 8.05 - Pireno - Area 1840957
RT 13.01 - Criseno - Area 258267
RT 22.57 - Indeno 1,2,3-c,d pireno - Area 239636

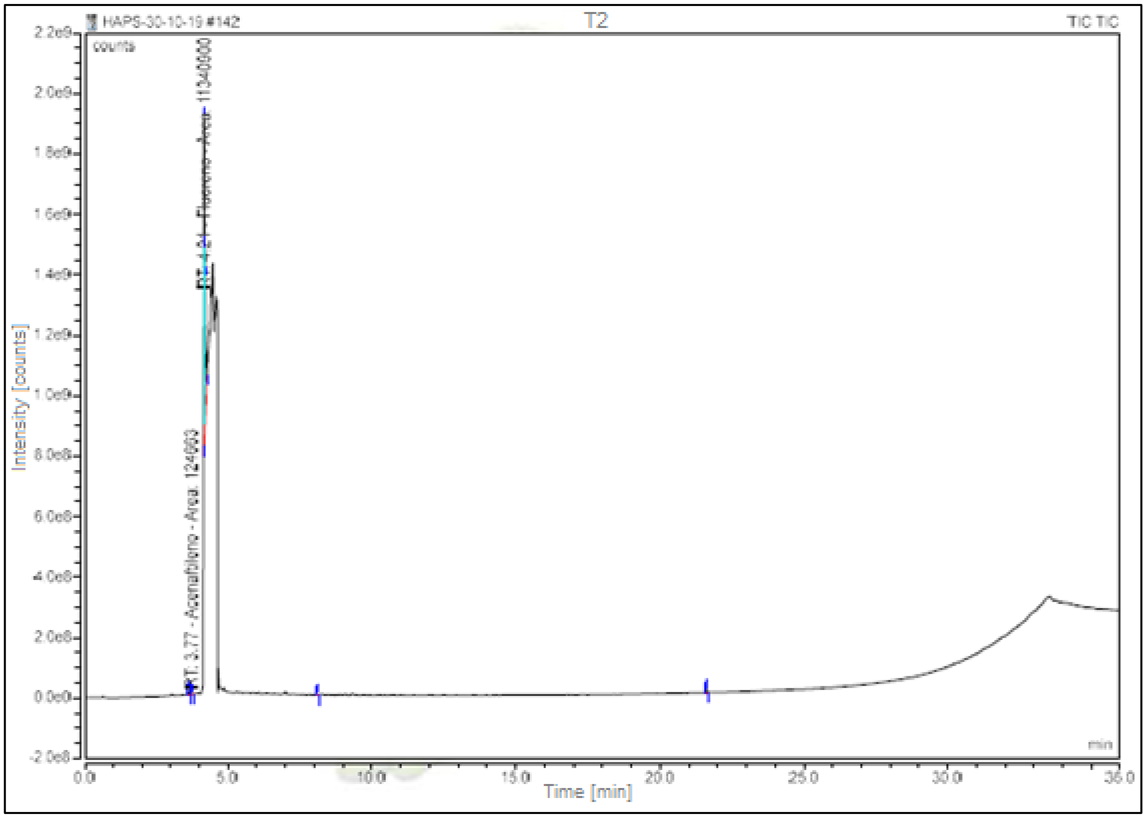

HAPS-30-10-19 #113
T4
TIC TIC
counts
Intensity [counts]
Time [min]
min
RT 3.66 - Acenafteno - Area 1660708
RT 6.05 - Pireno - Area 1043904
RT 12.99 - Criseno - Area 266593

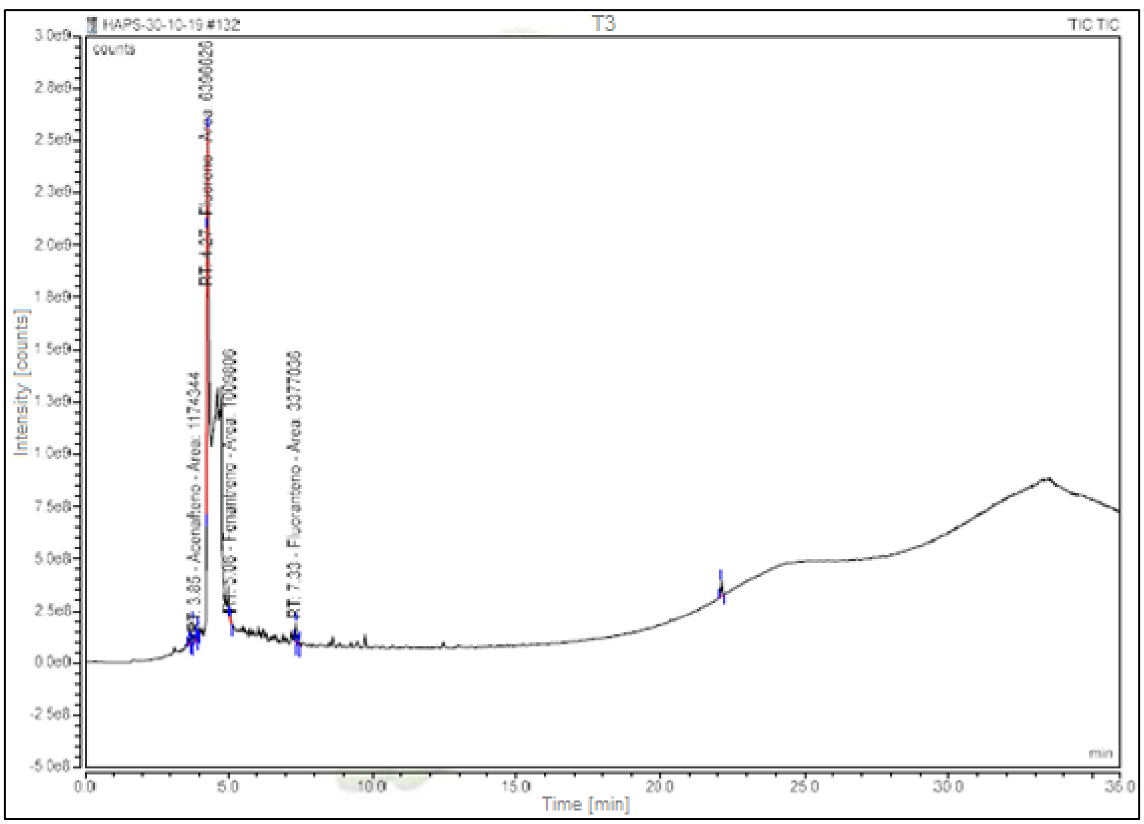

HAPS-30-10-19 #115
T5
TIC TIC
counts
Intensity [counts]
4.5e8
4.0e8
3.5e8
3.0e8
2.5e8
2.0e8
1.5e8
1.0e8
5.0e7
0.0e0
-5.0e7
RT: 8.04 - Pireno - Area: 1000060
min
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
Time [min]

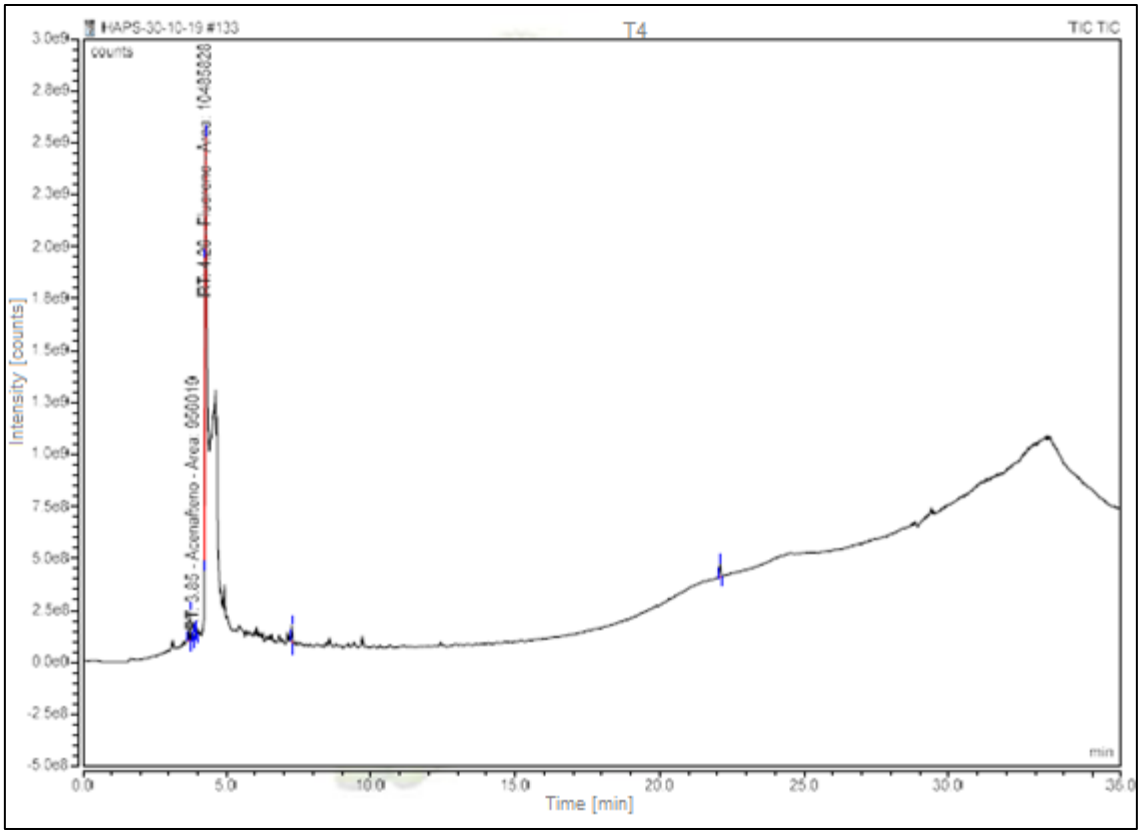

HAPS-30-10-19 #123
T6
TIC TIC
counts
Intensity [counts]
3.0e8
2.8e8
2.5e8
2.3e8
2.0e8
1.8e8
1.5e8
1.3e8
1.0e8
7.5e7
5.0e7
2.5e7
0.0e0
-2.5e7
-5.0e7
RT: 8.02 - Pireno - Area: 897051
RT: 12.97 - Criseno - Area: 184895
min
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
Time [min]

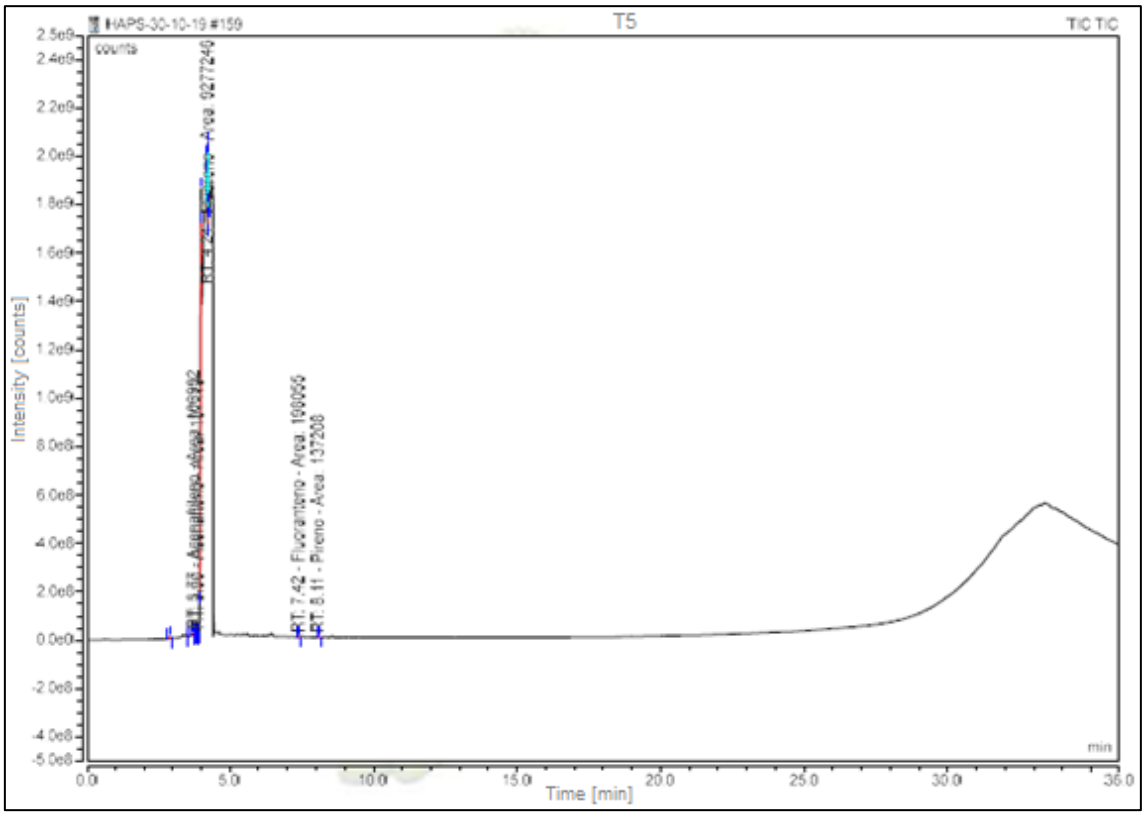
Anexo 5: Cromatogramas de todos los experimento transcurrido los 90 días de experimentación

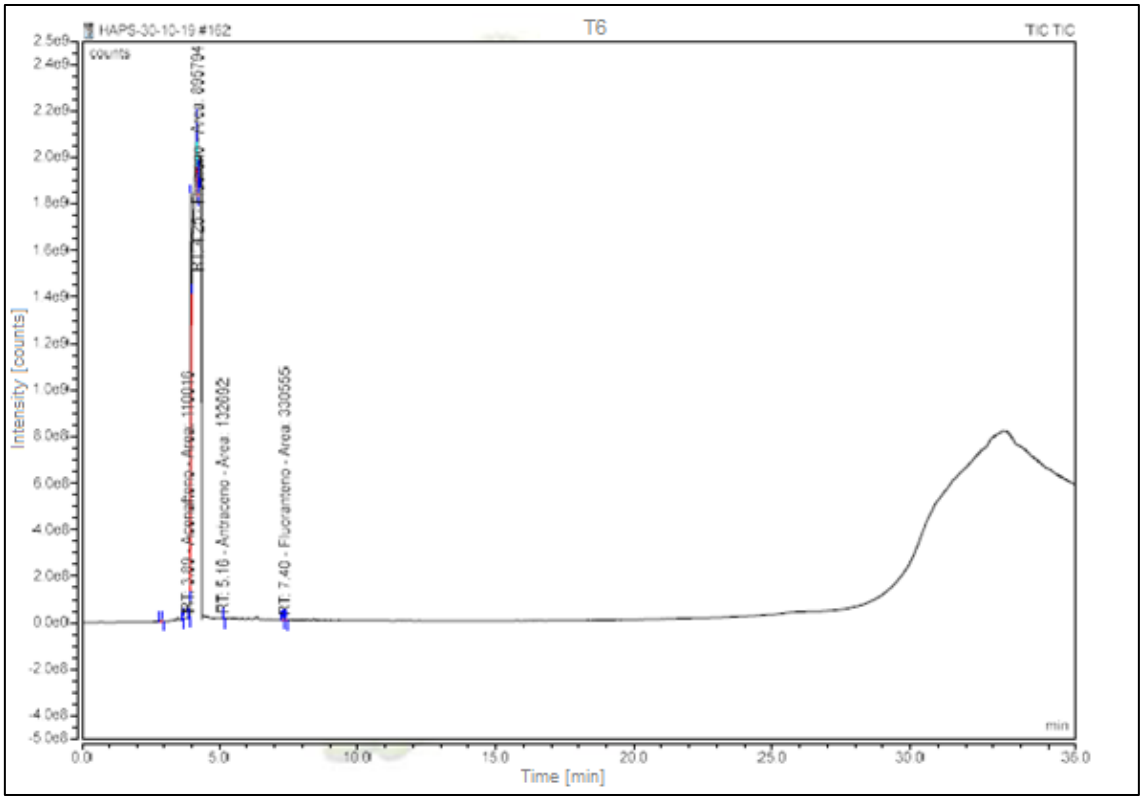



HAPS-30-10-19 #142
T2
TIC TIC
counts
Intensity [counts]
Time [min]
min
RT: 3.77 - Acenaftileno - Area: 124063


HAPS-30-10-19 #132
T3
TIC TIC
counts
Intensity [counts]
Time [min]
min
RT: 3.85 - Acenafteno - Area: 1174344
RT: 7.33 - Fluoranteno - Area: 3377036


HAPS-30-10-19 #133
T4
TIC TIC
counts
Intensity [counts]
Time [min]
min


HAPS-30-10-19 #159
T5
TIC TIC
counts
Intensity [counts]
Time [min]
min


HAPS-30-10-19 #162
T6
TIC TIC
counts
Intensity [counts]
Time [min]
min
RT: 3.89 - Acenafteno - Area: 110016
RT: 5.16 - Antraceno - Area: 132692
RT: 7.40 - Fluoranteno - Area: 330555