



# POSGRADOS

## MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES CON MENCIÓN EN REMEDIACIÓN Y RESTAURACIÓN

RPC-SO-17-NO.363-2020

### OPCIÓN DE TITULACIÓN:

PROYECTO DE TITULACIÓN CON  
COMPONENTES DE INVESTIGACIÓN  
APLICADA Y/O DE DESARROLLO

### TEMA:

BIORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS  
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAPS)  
PRESENTES EN LODOS RESIDUALES DE  
UNA LAVADORA DE VEHÍCULOS

### AUTOR:

LENIN EDUARDO GUARACA OCHOA

### DIRECTOR:

MANUEL ERNESTO DELGADO FERNÁNDEZ

CUENCA – ECUADOR  
2025

**Autor:****Lenin Eduardo Guaraca Ochoa.**

Ingeniero Ambiental.

Candidato a Magíster en Recursos Naturales Renovables con Mención en Remediación y Restauración por la Universidad Politécnica Salesiana – Cuenca.

lguaraca@est.ups.edu.ec.

**Dirigido por:****Manuel Ernesto Delgado Fernández**

Licenciado en Ciencias de la Educación en la Especialidad de Química, Biología y Ciencias Naturales.

Magister en Tecnologías para el Aprovechamiento de Recursos Naturales no Tradicionales.

Dottore di Ricerca in Ecologia Sperimentale e Geobotanica.

mdelgado@ups.edu.ec

Todos los derechos reservados.

Queda prohibida, salvo excepción prevista en la Ley, cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública y transformación de esta obra para fines comerciales, sin contar con autorización de los titulares de propiedad intelectual. La infracción de los derechos mencionados puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual. Se permite la libre difusión de este texto con fines académicos investigativos por cualquier medio, con la debida notificación a los autores.

**DERECHOS RESERVADOS**

2025 © Universidad Politécnica Salesiana.

CUENCA – ECUADOR – SUDAMÉRICA

LENIN EDUARDO GUARACA OCHOA

Biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPS) presentes en lodos residuales de una lavadora de vehículos

## ***DEDICATORIA***

El presente trabajo lo dedico con todo el cariño a mi amada esposa Rosario, mi preciosa hija Valentina, mis padres Noria y Jorge como también a mis hermanos Stalin y Estefanía quienes han sido mi apoyo y fortaleza en mi vida y sobre todo en esta etapa académica a través de sus palabras de aliento.

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento de todo corazón a todas las personas que de manera desinteresada aportaron con sus conocimientos para que este trabajo investigativo llegue a feliz término, de manera especial al Dr. Ernesto Delgado Fernández, tutor del trabajo por su valioso aporte en conocimiento y experiencia, de la misma manera a las Doctoras Inés Malo y Mónica Espadero como también al Dr. Pablo Arévalo por su paciencia y apoyo en la parte experimental desarrollada en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana.

# TABLA DE CONTENIDO

Resumen .....	8
Abstract .....	9
1. Introducción .....	10
2. Determinación del Problema.....	12
3. Marco Teórico Referencial .....	13
3.1.1. Lodos Residuales de una Lavadora de Vehículos .....	13
3.1.2. Tratamiento de Agua Residual .....	14
3.1.3. Electrocoagulación (EC) .....	14
3.1.4. Floculación-Flotación (FF).....	14
3.1.5. Filtración (F).....	15
3.1.6. Coagulación-Floculación (CF).....	15
3.1.7. Adsorción .....	15
3.1.8. Biorremediación .....	16
3.1.9. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) .....	16
3.1.10. Métodos Biológicos Remediación .....	17
4. Materiales y Metodología .....	18
4.1.1. Empresa Lavadora de Vehículos Yumbra.....	19
4.1.2. Lugar de Ensayo .....	20
4.1.3. Muestreo de Lodos Residuales .....	21
4.1.4. Determinación de la Concentración de HAP's Inicial .....	22
4.1.5. Pruebas de Tolerancia .....	25
4.1.6. Formación de Mesocosmos de Suelo.....	26
4.1.7. Formación de Inóculos Fúngicos .....	27
4.1.8. Concentración de HAP's Presentes en las Muestras de Lodos Luego del Proceso de Biorremediación .....	30
5. Resultados y discusión.....	33
5.1.1. Lugar de Ensayo .....	33
5.1.2. Resultados del Muestreo de Lodos Residuales de una Lavadora de Vehículos	33
5.1.3. Determinación de la Concentración de HAP's .....	34
5.1.4. Pruebas de Tolerancia .....	38
5.1.5. Conformación de los Mesocosmos de Suelo.....	40

---

5.1.6.	Formación de Inóculos fúngicos.....	41
5.1.7.	Resultados del Tratamiento de Biorremediación en la Concentración de HAP's Presentes en las Muestras de Lodos.....	41
6.	Conclusiones.....	44
7.	Referencias.....	46
8.	Anexos.....	49

BIORREMEDIACIÓN DE  
HIDROCARBUROS  
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS  
(HAP'S) PRESENTES EN LODOS  
RESIDUALES DE UNA  
LAVADORA DE VEHÍCULOS

AUTOR:

LENIN EDUARDO GUARACA OCHOA

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la efectividad de las especies fúngicas *Trichoderma citrinoviride* y *Trichoderma harzianum* en la biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) en lodos residuales de una lavadora de vehículos, con el fin de determinar su capacidad para reducir las concentraciones de estos contaminantes. La metodología implicó la recolección de muestras de lodo de tres diferentes puntos dentro de una lavadora de vehículos, las cuales se sometieron a secado, cuarteo, y extracción utilizando el método QuEChERS para luego determinar mediante cromatografía de gases acoplada a masas la presencia y concentración de HAP's. Se cultivaron cepas de *Trichoderma citrinoviride* y *Trichoderma harzianum*, que posteriormente fueron aplicadas a un mesocosmos que contenía lodo, suelo y materia orgánica. El experimento se realizó en un período de 90 días, durante los cuales se monitorizaron regularmente las concentraciones de HAP's para evaluar la efectividad de la biorremediación. Los resultados muestran que el *Trichoderma citrinoviride* demostró una reducción significativa en las concentraciones de varios HAP's, incluyendo una notable disminución de naftaleno de 95,0 µg/mg a 10,86 µg/mg. *Trichoderma harzianum* también redujo las concentraciones de HAP's, aunque en menor medida. Los análisis ANOVA indicaron que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la eficacia entre los tratamientos con *Trichoderma* spp. y el control. Con base en esta información, se concluyó que *Trichoderma citrinoviride* y *Trichoderma harzianum* presentan capacidad para reducir las concentraciones de HAP's en lodos contaminados, aunque la efectividad varió entre las especies y la *Trichoderma citrinoviride* fue más eficaz.

**Palabras clave:** Biorremediación, *Trichoderma citrinoviride*, *Trichoderma harzianum*, Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's), lodos residuales.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effectiveness of the fungal species *Trichoderma citrinoviride* and *Trichoderma harzianum* in the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in residual sludge from a vehicle wash, in order to determine their capacity to reduce the concentrations of these contaminants. The methodology involved collecting sludge samples from three different points within a vehicle wash, which were then subjected to drying, quartering, and extraction using the QuEChERS method to determine by gas chromatography coupled to mass the presence and concentration of PAHs. Strains of *Trichoderma citrinoviride* and *Trichoderma harzianum* were cultivated, which were later applied to a mesocosm containing sludge, soil, and organic matter. The experiment was conducted over a period of 90 days, during which PAH concentrations were regularly monitored to evaluate the effectiveness of the bioremediation. The results show that *Trichoderma citrinoviride* demonstrated a significant reduction in the concentrations of various PAHs, including a notable decrease in naphthalene from 95,0 µg/mg to 10,86 µg/mg. *Trichoderma harzianum* also reduced the concentrations of PAHs, albeit to a lesser extent. ANOVA analysis indicated that there were no statistically significant differences in efficacy between the *Trichoderma* spp. treatments and the control. Based on this information, it was concluded that *Trichoderma citrinoviride* and *Trichoderma harzianum* have the capacity to reduce PAH concentrations in contaminated sludge, although the effectiveness varied between the species. *Trichoderma citrinoviride* was more effective.

**Keywords:** Bioremediation, *Trichoderma citrinoviride*, *Trichoderma harzianum*, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), residual sludge.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

El servicio de lavado de autos es una de las actividades productivas que mayor cantidad de agua utiliza y que mayor contaminación genera, con un elevado consumo de agua y producción de aguas residuales con diversos tipos de contaminantes y detergentes (Torkashvand et al., 2022). En este contexto, aproximadamente 150 a 600 litros de agua dulce son consumidos por instalaciones de lavado de vehículos para realizar un lavado profesional completo en un solo vehículo, y se vierte la misma cantidad de agua sin tratamiento (Afzal et al., 2024).

En estudios previos la cantidad más baja y alta de consumo de agua para lavar un automóvil fue de 150 L y 600 L, respectivamente (Torkashvand et al., 2022). Algunos informes indican que la cantidad promedio de consumo de agua en los lavaderos de autos es de 200 litros por cada automóvil y 10,000 litros por día por cada estación de lavado de autos (Kashi et al., 2021). Por lo tanto, una de las fuentes importantes de producción de aguas residuales en el mundo son las unidades de lavado de autos, siendo los principales contaminantes el motor del automóvil o la contaminación ambiental del automóvil (Sarmadia et al., 2021).

No obstante, en este tipo de actividad, el uso intensivo de este elemento conlleva a una mayor generación de aguas que requieren técnicas más específicas de tratamiento, por ende, es necesario la aplicación de diferentes técnicas que van en función de las características del contaminante (tipo y tamaño), buscando garantizar su remoción, minimizando el impacto causado al medio ambiente.

Estos métodos incluyen un tratamiento primario enfocado a eliminar los aceites libres en emulsión, seguido de un tratamiento secundario, que requiere reducir la tensión superficial de la emulsión agua-aceite y eliminar el aceite disperso, y finalmente un tratamiento terciario que elimina la materia orgánica e inorgánica disuelta (Espinoza et al., 2023). Sin embargo, los métodos convencionales de tratamiento de aguas residuales

no son muy efectivos en la eliminación de estos contaminantes. Por lo tanto, el uso de métodos avanzados para eliminarlos es absolutamente necesario (Afzal et al., 2024).

La descarga de dichos contaminantes en las masas de agua superficial degrada la calidad del agua, al deteriorar algunas de las características físicas (turbidez), químicas (fertilizantes, metales pesados, detergentes) e incluso biológicas (exceso de bacterias) lo que a su vez afecta a los ecosistemas acuáticos y también perjudica el uso del agua para fines domésticos, industriales, agrícolas y recreativos (Monney et al., 2020). Estos contaminantes de las aguas residuales no solo degradan la calidad del agua superficial y la vida acuática, sino que sus altas concentraciones en las aguas subterráneas pueden marcarse como no potables (The government of New Hampshire, 2020).

Es importante mencionar que, las composiciones más comunes de las aguas residuales de lavado de autos son sólidos suspendidos (SS), detergentes, aceites y grasas (Sarmadia et al., 2021). Además de una amplia gama de contaminantes, como desechos de hidrocarburos del petróleo (gasolina, diésel y aceite de motor), nutrientes (fósforo y nitrógeno), tensioactivos, asfalto, sales, materia orgánica y metales pesados (Sharma et al., 2020).

También se han podido identificar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) en aguas residuales del lavado de autos, las cantidades más altas de estos compuestos fue de 1256 µg/L en un estudio realizado por Qamar, en 2017 en Pakistán, que incluía un total de 16 compuestos. Este tipo de hidrocarburos, son contaminantes orgánicos compuestos por dos o más anillos aromáticos fusionados de carbono e hidrógeno (Bharatkumar et al., 2020). Son motivo de gran preocupación ya que son potencialmente peligrosos debido a sus efectos altamente mutagénicos y cancerígenos (Barathi et al., 2023).

## 2. DETERMINACIÓN DEL PROBLEMA

Los HAP's, son contaminantes orgánicos complejos y altamente estables, plantean riesgos serios para la salud humana y los ecosistemas debido a su capacidad de bioacumulación y potencial carcinogénico. La eliminación efectiva de estos contaminantes es crucial, no solo para proteger la salud pública, sino también para preservar la integridad de los ecosistemas acuáticos y terrestres (Barathi et al., 2023).

En este sentido, la elección de estrategias adecuadas para la remediación de HAP's siempre es crítica, ya que depende en gran medida de dos parámetros principales: La matriz contaminada y condiciones ambientales (Ali et al., 2022). Entre los muchos enfoques de remediación, los métodos basados en microorganismos (siendo las técnicas de biorremediación) que son usados por elementos como los hongos, algas e incluso bacterias, los cuales tiene la capacidad para eliminar, transformar y degradar los contaminantes tóxicos, usándolos como una fuente de carbono e incluso energía, para la restauración ecológica de entornos contaminados por HAP's han sido un enfoque bien evaluado (Barathi et al., 2023).

Los metodos de tratamiento biologicos, se presentan como una alternativa eficaz y sostenible para los procesos de limpieza, el cual es un proceso que implica el uso de agentes biológicos con alta tolerancia a la toxicidad de los hidrocarburos, ha despertado un gran interés como método rentable y respetuoso con el medio ambiente para limpiar sitios contaminados (Fallahi et al., 2023). De hecho, la biorremediación puede ayudar a reducir los riesgos para los ecosistemas y la salud humana debido a la contaminación del suelo, y restaurar eficazmente los sitios contaminados, y generalmente se consideran tratamientos respetuosos con el medio ambiente.

Sin embargo, elegir el método de tratamiento apropiado, además de sus aspectos técnicos, económicas y ambientales, requiere un conocimiento completo de las propiedades de las aguas residuales producidas en estas unidades (Hui et al., 2022).

Además, desde el punto de vista operativo, la necesidad de implementar y mantener tecnologías de tratamiento de contaminantes eleva los costos de operación, impactando directamente en la rentabilidad de la empresa. Estos costos podrían incluir inversiones en nuevas tecnologías, el manejo y disposición especializada de lodos contaminados, así como el costo continuo de monitoreo y cumplimiento de regulaciones ambientales.

En este caso se efectuó la bioaugmentación con la adición de inóculos de aislados fúngicos *Trichoderma* en soluciones acuosas en diferentes concentraciones y bioestimulación con la adición de Nitrógeno, Fósforo y Potasio (presentación comercial NPK 15-15-15); además, se hizo el monitoreo de los parámetros abióticos como temperatura, pH, humedad, oxigenación (volteo).

### 3. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

A continuación se presentan los constructos teóricos que sustentan la investigación:

#### 3.1.1. LODOS RESIDUALES DE UNA LAVADORA DE VEHÍCULOS

Es el material que se acumula en las trampas de arena, trampas de lodo y sumideros de los lavados de autos. Este material está formado por arena, grava, mugre y otras sustancias que se lavan de la parte exterior de los vehículos. También existe la posibilidad de una disposición inadecuada de otros materiales por parte de los clientes (Oklahoma Department of Environmental, 2022).

### 3.1.2. TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL

Actualmente se considera la combinación de al menos dos técnicas de tratamiento que permite una alta eficiencia en el proceso.

### 3.1.3. ELECTROCOAGULACIÓN (EC)

En este método, se emplean hidróxidos metálicos generados a través de electrólisis para remover los contaminantes de las aguas residuales. Durante la reacción de electrólisis, un ánodo de sacrificio experimenta una reacción de oxidación para liberar iones metálicos, mientras que el cátodo experimenta una reacción de reducción para reducir los iones metálicos a metal y generar hidrógeno. Los ánodos metálicos comúnmente utilizados incluyen aluminio y hierro. El proceso de EC tiene una tasa de eliminación de turbidez de aproximadamente el 90%. Cuando se combina con tratamiento de adsorción o tratamiento de electro-oxidación, la tasa de eliminación de turbidez del proceso de EC puede aumentar. Además, el proceso de EC tiene una tasa de eliminación de DQO de aproximadamente el 80%. Cuando se combina con otros tratamientos, la tasa de eliminación de DQO del proceso de EC puede aumentar (Hui et al., 2022).

### 3.1.4. FLOCULACIÓN-FLOTACIÓN (FF)

Este procedimiento combina la adición de un floculante polimérico y la flotación por burbujas de aire para separar los contaminantes en aguas residuales de lavado de autos. Las tasas de eliminación de sólidos solubles (SS) y turbidez del proceso de FF son aproximadamente del 85% y del 90%, respectivamente. Cuando se combina con otros tratamientos, las tasas de eliminación de SS y turbidez de este proceso pueden alcanzar hasta el 96%. El proceso de FF tiene una tasa de eliminación de DQO de aproximadamente el 70 al 80%, que puede aumentar cuando este proceso se combina con otros tratamientos. Por lo tanto, el proceso de FF muestra un rendimiento de eliminación de turbidez y DQO comparable al del proceso de EC (Hui et al., 2022).

### 3.1.5. FILTRACIÓN (F)

En los últimos años, la filtración se ha convertido en un excelente método para la separación sólido-líquido, y la filtración por membrana se ha utilizado especialmente en muchos campos, como el procesamiento mineral, la eliminación de surfactantes, la filtración de suspensiones, y más. Cuando el elemento filtrante tiene suficiente selectividad, el proceso de floculación-filtración puede lograr tasas de eliminación de SS y turbidez superiores al 99% (Hui et al., 2022).

### 3.1.6. COAGULACIÓN-FLOCULACIÓN (CF)

En la coagulación, se agrega un coagulante como el cloruro de polialuminio (PAC) o el cloruro férrico al agua residual para modificar la carga superficial de los contaminantes de partículas, eliminando así la repulsión electrostática entre las partículas. Luego, se agrega el floculante (es decir, polímero) al agua residual para agregar las partículas electrostáticas casi neutras y formar flóculos para una eliminación más fácil de contaminantes. En general, la tasa de eliminación de turbidez de CF con aguas residuales de lavado de autos es buena, generalmente superior al 90%; sin embargo, las tasas de eliminación de DQO, O&G y AS no son tan buenas (Kashi et al., 2021).

### 3.1.7. ADSORCIÓN

Debido a la compleja matriz contaminante presente en las aguas residuales de los autolavados, métodos como la absorción no poseen una gran capacidad para tratar este tipo de aguas. Sin embargo, en algunos informes, se ha observado que la adsorción puede ser un mecanismo útil para la reducción de contaminantes sólidos y otros contaminantes mediante reacciones electrostáticas y de van der Waals. El rendimiento de este proceso está especialmente influenciado por el tamaño de las partículas y, otros factores como la alcalinidad del medio, la presencia de grupos funcionales y la carga negativa en la superficie del adsorbente. Utilizando adsorbentes naturales modificados, también es posible separar contaminantes como los metales (Kazembeigi et al., 2023).

### 3.1.8. BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación es un proceso de limpieza ambiental que utiliza organismos vivos, como microorganismos y/o plantas para degradar, inmovilizar o transformar contaminantes en el medio ambiente en productos menos tóxicos o no tóxicos. Esta técnica aprovecha la capacidad natural de ciertos organismos para metabolizar compuestos químicos peligrosos y convertirlos en formas menos dañinas, contribuyendo así a la restauración de suelos, aguas y aire contaminados. La biorremediación se considera una alternativa sostenible y respetuosa con el medio ambiente para abordar la contaminación, ya que minimiza la necesidad de productos químicos y procesos intensivos (Sher et al., 2023); (Ortiz, 2024); (Villagomez & Vasconez, 2021).

### 3.1.9. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP'S)

Grupo de contaminantes orgánicos compuestos por dos o más anillos aromáticos fusionados, pueden ser sólidos incoloros, blancos o de color amarillo pálido y tienen disposiciones moleculares lineales, angulares o en grupos. Se clasifican en HAP's de peso molecular ligero (con dos o tres anillos) y de peso molecular alto (cuatro o más anillos), emitiéndose como gas o partículas según su peso molecular. También se clasifican como alternantes (solo fusionan anillos de benceno de seis carbonos) o no alternantes (con un anillo adicional de menos de seis carbonos). La presencia de densos electrones  $\pi$  en los anillos aromáticos le confiere persistencia bioquímica y resistencia al ataque nucleofílico (Bharatkumar et al., 2020).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) ha declarado 16 HAP's como contaminantes prioritarios en 1983 basándose en su existencia de concentraciones más altas, mayor exposición, naturaleza recalcitrante y toxicidad (Mojiri et al., 2019).

### 3.1.10. MÉTODOS BIOLÓGICOS REMEDIACIÓN

Se han identificado diversas técnicas biológicas especializadas, como la atenuación natural, la bioaumentación y la biostimulación, que se utilizan con mayor frecuencia. Estos métodos se basan en la capacidad de ciertos microorganismos para degradar los HAP's de manera natural o con la ayuda de estímulos externos (Bharatkumar et al., 2020):

- Capacidad para la degradación microbiana: es importante resaltar el potencial de las bacterias y los hongos para degradar los HAP's. Se ha observado que las bacterias tienen una versatilidad metabólica única que les permite degradar estos contaminantes tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Los hongos, por otro lado, pueden utilizar enzimas como las ligninoperoxidasas y las lacasas para descomponer los HAP's en productos oxidados menos tóxicos.
- Microorganismos extremófilos: diversos estudios han demostrado que ciertos microorganismos extremófilos, como las bacterias halófilas, acidófilas y termófilas, poseen una notable efectividad en la degradación de HAP's. Estos microorganismos pueden sobrevivir y funcionar en condiciones ambientales extremas, lo que los convierte en agentes de alto valor en entornos contaminados.
- Arqueas: Aunque menos estudiadas que las bacterias y los hongos, las arqueas han despertado interés en la biorremediación de HAP's. Especialmente en entornos extremos como regiones salinas, se ha observado que ciertas arqueas son capaces de degradar HAP's, lo que sugiere su potencial aplicación en la limpieza de sitios contaminados.
- Micorremediación: Los hongos juegan un papel fundamental para la biorremediación de los HAP's, siendo ampliamente estudiados. Se ha demostrado que los hongos ligninolíticos y no ligninolíticos pueden degradar eficazmente estos compuestos, utilizando una variedad de enzimas y

mecanismos metabólicos para descomponer los HAP's en productos menos tóxicos.

- Biorremediación por algas: Las algas también se han investigado como agentes potenciales para la biorremediación de HAP's en entornos acuáticos. Se ha observado que ciertas especies de algas pueden degradar HAP's utilizando enzimas y mecanismos metabólicos específicos, lo que sugiere su posible aplicación en la limpieza de cuerpos de agua contaminados.
- Enfoques de co-cultivos: Se han desarrollado enfoques de co-cultivos que involucran la combinación de diferentes microorganismos, como bacterias-fúngicas, fúngicas-algales y bacterianas-algales, para mejorar la eficiencia de la biorremediación de HAP's. Estos enfoques pueden aprovechar las fortalezas de diferentes tipos de microorganismos para mejorar la degradación de HAP's en diversos entornos.
- Biorremediación mediada por enzimas microbianas: La biorremediación mediada por enzimas implica el uso de enzimas aisladas de microorganismos para la degradación de HAP's. Estas enzimas pueden catalizar reacciones específicas que descomponen los HAP's en productos menos tóxicos, ofreciendo una alternativa eficiente y selectiva para la remediación de la contaminación por HAP's.

## 4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

Para la empresa Lavadora de Vehículos Yumbra, la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) en los lodos residuales representa un problema que afecta tanto la operación del negocio como su sostenibilidad a largo plazo. Primero, desde un punto de vista regulatorio, la existencia de HAP's puede derivar en multas, sanciones y la imposición de requerimientos de remedio más rigurosos si no cumplen con los límites permitidos de contaminación.

## 4.1.1. EMPRESA LAVADORA DE VEHÍCULOS YUMBLA

La lavadora de vehículos Yumbra se encuentra ubicada en la ciudad de Cuenca, parroquia Baños en la Avd. Ricardo Durán; cuyas coordenadas son 716693 E y 9677026 S como se puede apreciar en el siguiente mapa:



Ilustración 1. Ubicación de la Lavadora de Vehículos Yumbra

La “Lavadora de Vehículos Yumbra” cuenta con la “Ficha Ambiental y Plan de Manejo Ambiental” mediante la cual obtuvo la Licencia Ambiental N° 214-CGA-II con fecha 26 de agosto de 2015 (Lavadora y Lubricadora DIABLOSCAR WASH, 2022).

## 4.1.2. LUGAR DE ENSAYO

El lugar del ensayo experimental se encuentra ubicado en la ciudad de Cuenca parroquia Yanuncay en las calles José María de Pereda y Alonso Quijano. coordenadas 719015 E y 9677891 S y se encuentra representado en la siguiente ilustración.



Ilustración 2. Ubicación del lugar de ensayo

Se identificó que la empresa realiza un promedio diario de 30 lavados a vehículos, los que es un equivalente a 180 semanales (6 días laborales) y 780 mensuales (26 días al mes). Lo que implica como una carga operativa una generación de manera constante de

aguas residuales y lodos con altos contenidos de aceites, grasas, metales, pesados y combustibles que son persistentes.

Se obtuvo un volumen promedio residual estimado de 1,5 litros por cada vehículo tratado (Tabla 1).

Periodo	Vehículos Lavados	Volumen Estimado de Lodo (L)
Diario	30	45
Semanal (6 días)	180	270
Mensual (26 días)	780	1170
Anual	9360	14040

*Nota.* Elaboración propia.

**Tabla 1.** Estimación de lodo residual generado en la empresa.

### 4.1.3. MUESTREO DE LODOS RESIDUALES

Se realizó un muestreo aleatorio simple que permitió obtener una muestra representativa en función de los lodos contaminados que son generados dentro de la lavadora de vehículos Yumbra. Para ellos fueron seleccionadas tres puntos específicos en la trampa de lodos (ilustración 9), grasas y aceites del sistema de tratamientos primarios en el sector de aguas residuales. En cada punto fue recolectada una muestra de manera individual con la ayuda de un balde para su colección directa. Estas fueron filtradas a través de una tela fina buscando de esa forma la separación de las fracciones sólidas y líquidas, lo que arrojó como resultado un total de 3 kg de material semisólido, el cual fue extendido sobre una tela seca que se expuso bajo condiciones naturales al aire libre, permitiendo de esa forma que se alcanzara una humedad cercana al 70%, lo que es un valor adecuado para los procesos y tratamientos de técnicas de biorremediación.

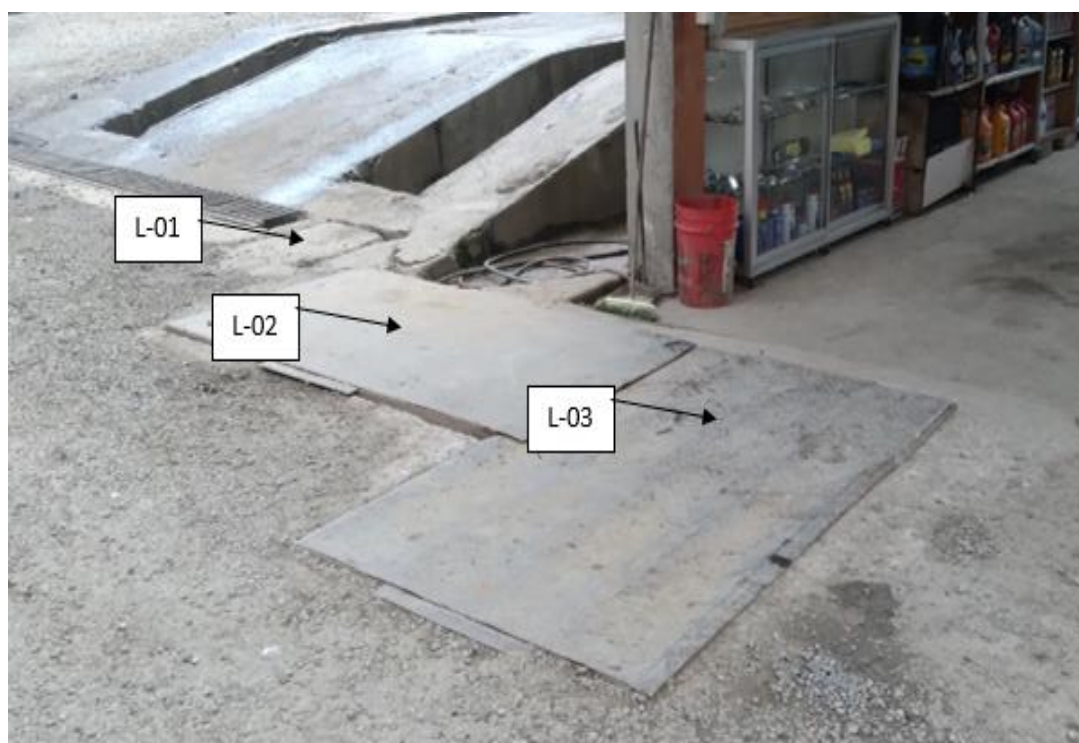


Ilustración 3. Puntos de Muestreo de los lodos

#### 4.1.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE HAP'S INICIAL

Para la adecuada cuantificación de los HAP's, fue realizado un método analítico que fue basado en Cromatografía de Gases acoplado a la Espectrometría de Masas (GC-MS), la cual permite la separación, identificación, y cuantificación de todos los compuestos orgánicos que poseen alta sensibilidad y especificidad (Universidad Complutense de Madrid, 2018).

La preparación de las muestras de lodos se realizó en los laboratorios de Ciencias de la Vida mediante la técnica de QuEChERS la cual consiste en:

Paso	Descripción
Paso 1: Preparación de la muestra	Pesar 5g de lodo seco y transferir a un tubo Falcon de 50 ml. Añadir 10 ml de acetonitrilo, 5 ml de agua destilada, 6 g de sulfato de magnesio, y 1,5 g de acetato de sodio. Agitar con agitador vórtex durante un minuto y centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos (Waters, 2012) (Anexo 1).
Paso 2: Extracción de la solución	Transferir 5 ml de la solución sobrenadante a un tubo Falcon de 15 ml que contiene 50 mg de amina secundaria, 50 mg de silicagel, y 150 mg de sulfato de magnesio. Agitar por un minuto usando agitador vórtex y centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos. Tomar 3 ml del sobrenadante con una jeringa (Anexo 2).
Paso 3: Filtración y análisis cromatográfico	Colocar un filtro perinola en la boca de la jeringa y filtrar 1,5 ml de la solución en un vial para el análisis en cromatógrafo de gases (Thermo TRACE GC Ultra) acoplado a espectrómetro de masas (MS ISQ 7000). Como referencia de las concentraciones de HAP's se utilizó una solución estándar cuyo nombre comercial es PAH-MIX39 en acetonitrilo y que está compuesto por 16 HAP's.

Tabla 2. Procedimiento experimental para realizar la extracción y análisis de HAP's en lodos residuales mediante la técnica GC-MS.

La cuantificación se hizo mediante el empleo de un cromatógrafo de gases de la marca Thermo modelo TRACE GC Ultra acoplado a un espectrómetro de masas MS ISQ 7000 Single Quadrupole Mass Spectrometer equipado con una columna TG 5MS (30m x 0,25 mm de diámetro x 0,25  $\mu$ m de espesor de película).

Cada muestra se analizó por duplicado, para lo cual se colocaron los viales en la bandeja del equipo antes mencionado, el cual con el empleo de un brazo automático que incluye una jeringa extrajo 1  $\mu$ l de cada muestra y lo inyectaba en el analizador; de igual manera se procedió con los estándares.

Los rangos de temperatura y los tiempos utilizados en el horno para tratar las diferentes muestras se detallan en la tabla siguiente:

T0 (°C)	TF (°C)	Tiempo (min)	Rango de Temperatura (°C/min)
80	80	1	-
80	200	5	40
200	325	25	5

Tabla 3. Rampas de temperaturas en el análisis.

La siguiente tabla muestra los límites de detección de las concentraciones de HAP's, establecidos según las concentraciones detectadas en la solución estandar:

Parámetro	Límite de detección ug/mg
Naftaleno	5,24
Acenaftileno	5,24
Acenafteno	2,62
Fluoreno	1,31
Fenantreno	2,62
Antraceno	0,524
Fluoranteno	2,62
Pireno	2,62
Benzo(a)antraceno	1,31
Criseno	1,31
Benzo(b)fluoranteno	1,31
Benzo(k)fluoranteno	0,524
Benzo(a)pireno	1,31
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	5,24
Dibenzo(a,h)antraceno	2,62
Benzo(ghi)perileno	2,62

Tabla 4. Límites de detección del equipo

Nota (cabe indicar que en el presente estudio se analizaron los 16 HAP's considerados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) como contaminantes prioritarios).

Las concentraciones fueron verificadas por un laboratorio acreditado por el Servicio de Acreditación Ecuatoriana (SAE). Una vez identificados los HAP's en las muestras de lodos y determinadas sus concentraciones, se dio inicio a la fase experimental, que incluyó tres etapas distintas.

#### 4.1.5. PRUEBAS DE TOLERANCIA

Las pruebas de tolerancia *in vitro* se hicieron con el propósito de corroborar la capacidad de crecimiento del hongo con respecto a la presencia de un contaminante, para lo cual se procedió a sembrar en cajas Petri con medio PDA (Potato dextrose agar) las especies de hongos por separado a una distancia de 2,5 cm desde el borde de la caja, para que sirvan como testigos. En otras cajas, se siguió el mismo procedimiento, pero con la diferencia de que en el extremo opuesto se colocó una muestra de lodo residual, lo cual permitió observar si el hongo se desarrollaba adecuadamente o si era repelido por el contaminante (Hoyos et al., 2019; Stamatiu et al., 2015).

El análisis de desarrollo fúngico fue llevado a cabo empleando la escala de Bell, siendo un método cualitativo que garantiza determinar el rango de inhibición de las cepas (Sanabria Velázquez, 2020). Este análisis evalúa visualmente la interacción o desarrollo de las cepas del hongo dentro de la caja Petri que contenía la muestra de lodo residual, comparándolo con el desarrollo de las cepas en las cajas Petri testigo (sin muestra de lodo). La clasificación de antagonismo o tolerancia se basa en cinco criterios o clases, los cuales se detallan a continuación: (Bell et al., 1982).

Esta evaluación se realiza mediante la observación visual de la interacción o crecimiento de las cepas de hongos en cajas Petri que contienen la muestra de lodo residual, comparándolas con cajas Petri control (sin lodo). La clasificación del grado de antagonismo o tolerancia se establece según cinco categorías definidas por Bell et al. (1982), las cuales se describen a continuación.

Clase	Características
I	<i>Trichoderma</i> spp. crece completamente sobre las colonias de patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo.
II	<i>Trichoderma</i> spp. crece al menos sobre las 2 terceras partes de la superficie del medio de cultivo.
III	<i>Trichoderma</i> spp. y el patógeno cubren aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo.
IV	El patógeno cubre al menos las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo limitando el crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp.
V	El patógeno crece sobre la colonia de <i>Trichoderma</i> spp. ocupando toda la superficie del medio de cultivo.

Tabla 5. Escalas de las clases de Bell.

#### 4.1.6. FORMACIÓN DE MESOCOSMOS DE SUELO

Para la evaluación del proceso de biorremediación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's), se diseñaron mesocosmos de suelo con una composición específica que simula las condiciones de un ambiente contaminado. El diseño de los mesocosmos permitió simular las condiciones de un ambiente contaminado con HAP's, proporcionando un sistema controlado donde se evaluó la eficiencia de *Trichoderma citrinoviride* (F11) y *Trichoderma harzianum* (J1) en la biorremediación.

A continuación se muestra la conformación de los mesocosmos del suelo diseñado para el presente trabajo:

Componente	Cantidad (kg)	Porcentaje (%)
Lodo Residual	2,5	83,33
Suelo (suelo agrícola)	0,4	13,33
Materia orgánica vegetal (hojarasca)	0,1	3,33
Total	3,0	100,00

Tabla 6. Conformación de los mesocosmos del suelo

El proceso de preparación de los mesocosmos inició recolectando hojarasca para luego secarla y triturarla antes de integrarla cuidadosamente en la mezcla finalizada de suelo agrícola y lodo residual en recipientes de 5 L siguiendo las proporciones establecidas junto a la materia orgánica triturada también añadida posteriormente. La homogeneización manual permitió asegurar una distribución equilibrada de los componentes y mantener la coherencia del sustrato en cada recipiente; este paso facilitó el desarrollo óptimo de los microorganismos involucrados en el proceso de biorremediación.



Ilustración 4. Trituración de hojarasca para la preparación del mesocosmos



Ilustración 5. Preparación de la mezcla para la preparación del mesocosmos

*Nota.* Se muestra la preparación y disposición del mesocosmos utilizado en la etapa experimental del estudio sobre la biorremediación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) mediante cepas de *Trichoderma spp.*

#### 4.1.7. FORMACIÓN DE INÓCULOS FÚNGICOS

La preparación de los inóculos fúngicos permitió obtener una cantidad adecuada de esporas viables de *Trichoderma citrinoviride* Bissett (F11), y *Trichoderma harzianum*(J1), para su uso en los mesocosmos de lodo contaminado. El propósito de este procedimiento era asegurar un crecimiento óptimo de los hongos y su capacidad para descomponer los HAP's que se encuentran en el lodo residual.

##### 1. Obtención y preparación del inóculo

Se comenzó seleccionando y cultivando por separado ambas variedades de *Trichoderma spp* en medio de PDA (Agar Papa Dextrosa). Luego se transfirieron a frascos de 1000 ml conteniendo 50 ml de PDA líquido y se mantuvieron en condiciones controladas de incubación a 27 °C durante 15 días para promover su crecimiento.



Ilustración 6. Extracción de las cepas

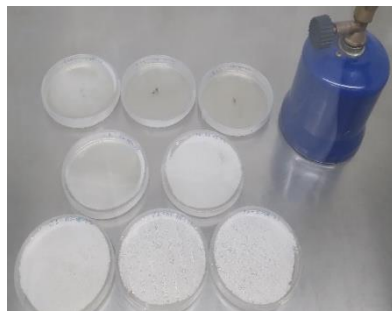


Ilustración 7. Siembra de cepas en las cajas Petri



Ilustración 8. Desarrollo de cepas de *Trichoderma harzianum* (J1)



Ilustración 9. Desarrollo de cepas de *T. citrinoviride* Bissett (F11)

*Nota.* Se muestra el proceso de control y desarrollo de las cepas de *Trichoderma citrinoviride* Bissett (F11) y *Trichoderma harzianum* (J1) durante el estudio de biorremediación.

## 2. Lavado y concentración del inóculo

Después de la incubación, se llevó a cabo un enjuague de las colonias utilizando 100 ml de agua estéril en repetidas ocasiones hasta obtener una suspensión fúngica de 500 ml completa. Posteriormente, se filtró la solución resultante mediante gasas estériles para eliminar cualquier residuo sólido y se añadieron 100 ml de una solución al 5 % de sacarosa para conservar la viabilidad de las esporas y mejorar su estabilidad antes de aplicarse en los mesocosmos (Bermeo, 2018).



Ilustración 10. Trasplante de cepas al matraz



Ilustración 11. Incubación de cepas

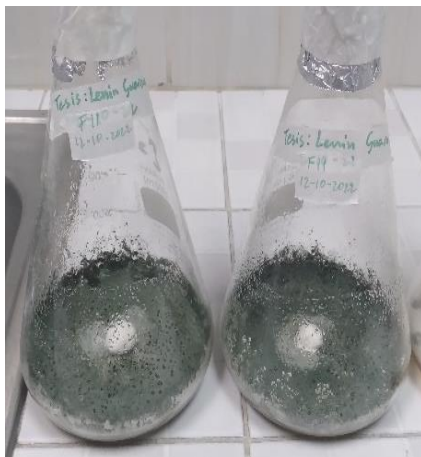


Ilustración 12. Desarrollo de *T. citrinoviride* Bissett (F11)



Ilustración 13. Desarrollo de *Trichoderma harzianum* (J1)

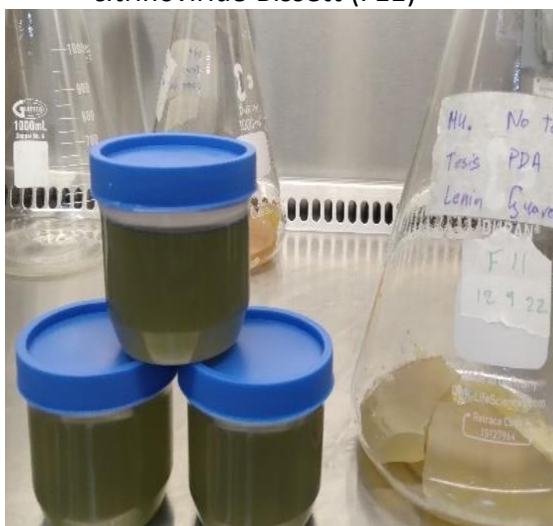


Ilustración 14. Lavado de las colonias de *T. citrinoviride* Bissett (F11)



Ilustración 15. Lavado de las colonias *Trichoderma harzianum* (J1)

Nota. Se muestra el proceso de lavado de las colonias de las cepas *Trichoderma citrinoviride* Bissett (F11) y *Trichoderma harzianum* (J1) utilizando una solución de dextrosa.

## 4.1.8. CONCENTRACIÓN DE HAP'S PRESENTES EN LAS MUESTRAS DE LODOS LUEGO DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

### 1. Muestreo de lodos en los mesocosmos

Para evaluar la eficiencia del proceso de biorremediación, se tomaron muestras de suelo del mesocosmos a intervalos regulares, desde el día 0 hasta el día 90. El muestreo se realizó cada 30 días, antes de la incorporación de nuevas soluciones de inóculo, siguiendo la técnica de cuarteo para garantizar la representatividad de la muestra.

- Cantidad de muestra por mesocosmo: 15 g de lodo
- Frecuencia de muestreo: Cada 30 días (Día 0, Día 30, Día 60, Día 90)

### Condiciones de los Mesocosmos

- Humedad mantenida al 70%, con 200 ml de agua cada 5 días.
- Remoción de la mezcla cada 2 días para oxigenación.
- Aplicación de N-P-K (100 ml cada 10 días) para bioestimulación de los hongos.



Ilustración 16. Muestra de lodo del día utilizado para la determinación de los HAP's en las muestras de mesocosmos

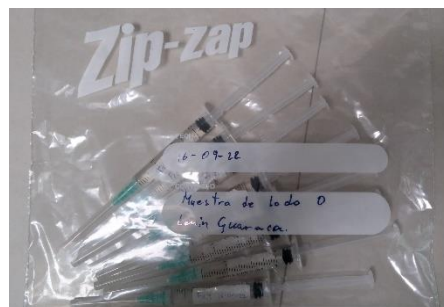


Ilustración 17. Extracción de muestra de lodo del día 0

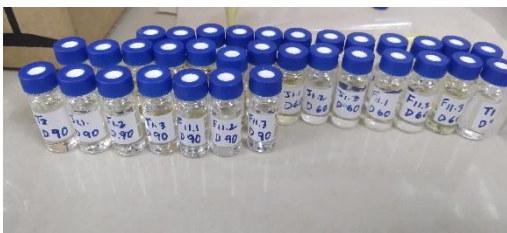


Ilustración 18. Muestras de lodos listas para el análisis



Ilustración 19. Análisis de las muestras de lodo

*Nota.* Se muestra el meticuloso procedimiento para determinar la presencia y concentración de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) en las muestras de lodo extraídas de las cajas del mesocosmos, como parte de un estudio de biorremediación.

## 2. Diseño experimental

El diseño experimental se realizó de la siguiente manera: 2 cajas destinadas para testigo que no recibirían inóculos de los hongos, 3 cajas destinadas para tratamiento con *Trichoderma harzianum* (J1) y las 3 cajas restantes para tratamiento con *T. citrinoviride* Bissett (F11) estas se hidrataban regularmente con 200 ml de agua cada 5 días procurando mantener una humedad de 70 %, se removían cada 2 días para oxigenar la mezcla; y adicionalmente cada 10 días se adicionaba 100 ml de una solución de N-P-K para bioestimular el desarrollo de las cepas.

El estudio se desarrolló bajo un diseño completamente aleatorizado con tres tratamientos y un grupo testigo. Se utilizaron mesocosmos de suelo como unidades experimentales, en los cuales se aplicaron dos especies de *Trichoderma spp.* para evaluar su capacidad de biorremediación de HAP's en lodos contaminados. Cada tratamiento se replicó tres veces, asegurando una adecuada representatividad estadística. Las condiciones ambientales, como humedad y temperatura, se mantuvieron controladas durante todo el experimento.

### Factores y niveles del diseño experimental

- Factor principal: Tipo de tratamiento fúngico.
- Niveles:
  - Testigo (sin inóculo).
  - Tratamiento con *Trichoderma harzianum* (J1).

- Tratamiento con *Trichoderma citrinoviride* (F11).

Tratamiento	Código	Aplicación del hongo	Número de repeticiones	Volumen de inóculo aplicado
Testigo (sin inóculo)	T0	No	3	No aplica
<i>Trichoderma harzianum</i> (J1)	T1	200 ml cada 5 días	3	500 ml de suspensión fúngica
<i>Trichoderma citrinoviride</i> (F11)	T2	200 ml cada 5 días	3	500 ml de suspensión fúngica

Tabla 7. Distribución de tratamientos en el experimento

### 3. Cuantificación de HAP's en Lodo Tratado

Para determinar la eficiencia del tratamiento, se cuantificaron los HAP's en las muestras de lodo mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS), siguiendo los procedimientos estándar previamente descritos.

### 4. Análisis Estadístico

Para evaluar si la reducción de HAP's fue estadísticamente significativa, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA), comparando las concentraciones de los HAP's al inicio y al final de ambos tratamientos y se llevó a cabo un Análisis de Varianza (ANOVA) para determinar si había diferencias significativas en la reducción de contaminantes entre los tratamientos aplicados y el grupo de control.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1.1. LUGAR DE ENSAYO

Las empresas de autolavado han sido identificadas como fuentes significativas de contaminación ambiental, tal como lo evidencian algunas literaturas a nivel mundial. Este grupo de instalaciones generan una gran cantidad de flujo constante de aguas residuales que generalmente viene cargadas de una serie de productos químicos usados para la limpieza de autos y que contaminan el medio ambiente.

Dentro del conjunto de principales compuestos que están presentes en las aguas residuales se pueden encontrar hidrocarburos, metales pesados e incluso algunos solventes. Si estos elementos no son tratados de manera adecuada desarrollan un potencial para infiltrarse en cualquiera de los sistemas hídricos locales, lo que genera un riesgo y compromiso sobre la calidad de la vida acuática y eventualmente sobre la salud humana.

Esta situación es preocupante por la acumulación de sedimentos, lodos e incluso aceites en las trampas de aceite de los diferentes establecimientos, debido a su tendencia a desarrollar altas concentraciones sobre los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), convirtiéndolos en un riesgo ambiental y sanitario que debe ser abordado de manera detallada y sistemática, buscando de esa forma su remediación.

### 5.1.2. RESULTADOS DEL MUESTREO DE LODOS RESIDUALES DE UNA LAVADORA DE VEHÍCULOS

Se extrajeron muestras de tres puntos distintos dentro de la trampa de lodos, grasas y aceites, cada uno representativo de una sección diferente del sistema de tratamiento. Este muestreo simple permitió obtener muestras sólidas de aproximadamente 3 kg cada

una, las cuales fueron filtradas y secadas al aire hasta alcanzar un contenido de humedad de cerca del 70%. Este procedimiento no solo asegura la consistencia en la preparación de las muestras sino que también permite una comparación efectiva entre los puntos de muestreo para identificar variaciones en la concentración de contaminantes.

### 5.1.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE HAP'S

En la tabla 8, se presentan los resultados de las concentraciones de HAP's en las muestras de lodo obtenidas de los puntos de muestreo establecidos previo al procesos de biorremediación propuesto. Cada punto fue muestreado en tres ocasiones distintas para asegurar la repetibilidad y precisión de los datos:

HAP's	Concentración	Concentración	Concentración	Concentración	Concentración	Concentración
	(µg/mg)	(µg/mg)	(µg/mg)	(µg/mg)	(µg/mg)	(µg/mg)
	Punto 1 Muestra 1	Punto 1 Muestra 2	Punto 2 Muestra 1	Punto 2 Muestra 2	Punto 3 Muestra 1	Punto 3 Muestra 2
Naftaleno	140,084	64,676	138,650	-	135,910	136,315
Acenaftileno	< 5,24	< 5,24	< 5,24	-	-	< 5,24
Acenafteno	82,438	-	-	-	84,125	84,294
Fluoreno	-	< 2,62	< 1,31	-	< 1,31	-
Fenantreno	< 2,62	-	-	-	-	-
Benzo[a]antraceno	15,538	13,683	29,226	30,109	17,475	17,799
Benzo[b]fluoranteno	-	-	26,701	26,005	-	-
Benzo[k]fluoranteno	-	-	< 0,524	< 0,524	-	-
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	-	< 5,24	-	-	-	-
TOTAL:	23,81	7,84	19,46	5,61	23,75	23,84

Tabla 8. Resultados de los lodos iniciales

De acuerdo al método analítico, existen algunos HAP's que se encuentran por debajo del límite de detección (Ver Tabla 4), lo cual puede complicar la interpretación de los resultados y subraya la necesidad de utilizar métodos analíticos más sensibles o

recolectar más muestras para una confirmación más robusta de las tendencias observadas.

Los resultados de los análisis de los lodos iniciales muestran que, el Naftaleno presenta las concentraciones más altas en todos los puntos, con valores que oscilan entre 64,676 y 140,084  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . El Acenaftileno y el Indeno[1,2,3-c,d]pireno están por debajo del límite de detección en la mayoría de las muestras.

El Acenafteno y el Benzo[a]antraceno presentan concentraciones detectables en algunos puntos, mientras que el Fluoreno y el Fenantreno generalmente están por debajo del límite de detección. Las concentraciones de Benzo[b]fluoranteno y Benzo[k]fluoranteno son variables, con algunas muestras mostrando niveles detectables y otras no. Los valores totales de HAP's (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos) son relativamente bajos en general, con el Punto 1 Muestra 1 presentando el valor total más alto (23,81  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) y el Punto 2 Muestra 2 el más bajo (5,61  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ).

De igual manera, y con el fin de validar los resultados previos, se realizaron analisis adicionales de las concentraciones de HAP's en las muestras de lodo obtenidas de los puntos de muestreo a traves de un laboratorio externo acreditado a nivel nacional, lo que garantiza que los procedimientos y mediciones se han realizado según estándares reconocidos de precisión y confiabilidad, cuyos resultados se presentan en la Tabla 9:

Parámetro	Unidades	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Naftaleno	mg/Kg	<0,625 ± 0,18	<0,625 ± 0,18	<0,625 ± 0,18
Acenaftileno	mg/Kg	<0,625 ± 0,16	<0,625 ± 0,16	<0,625 ± 0,16
Acenafteno	mg/Kg	<0,625 ± 0,16	<0,625 ± 0,16	<0,625 ± 0,16
Fluoreno	mg/Kg	<0,625 ± 0,18	<0,625 ± 0,18	<0,625 ± 0,18
Fenantreno	mg/Kg	<0,625 ± 0,15	<0,625 ± 0,15	<0,625 ± 0,15
Antraceno	mg/Kg	<0,625 ± 0,13	<0,625 ± 0,13	<0,625 ± 0,13
Fluoranteno	mg/Kg	<0,625 ± 0,18	<0,625 ± 0,18	<0,625 ± 0,18
Pireno	mg/Kg	<0,625 ± 0,17	<0,625 ± 0,17	<0,625 ± 0,17
Benzo (a) antraceno	mg/Kg	<0,625 ± 0,033	<0,625 ± 0,033	<0,625 ± 0,033
Criseno	mg/Kg	<0,625 ± 0,18	<0,625 ± 0,18	<0,625 ± 0,18
Benzo (b) fluoranteno	mg/Kg	<0,625 ± 0,11	<0,625 ± 0,11	<0,625 ± 0,11
Benzo (k) fluoranteno	mg/Kg	<0,625 ± 0,14	<0,625 ± 0,14	<0,625 ± 0,14
Benzo (a) pireno	mg/Kg	<0,625 ± 0,10	<0,625 ± 0,10	<0,625 ± 0,10
Indeno (1,2,3 cd) pireno	mg/Kg	<0,625 ± 0,12	<0,625 ± 0,12	<0,625 ± 0,12

Dibenzo (a,h) antraceno	mg/Kg	<0,625 ± 0,16	<0,625 ± 0,16	<0,625 ± 0,16
Benzo (g,h,i) perileno	mg/Kg	<0,625 ± 0,15	<0,625 ± 0,15	<0,625 ± 0,15

Tabla 9. Resultados de las muestras de lodo iniciales efectuadas por el laboratorio externo

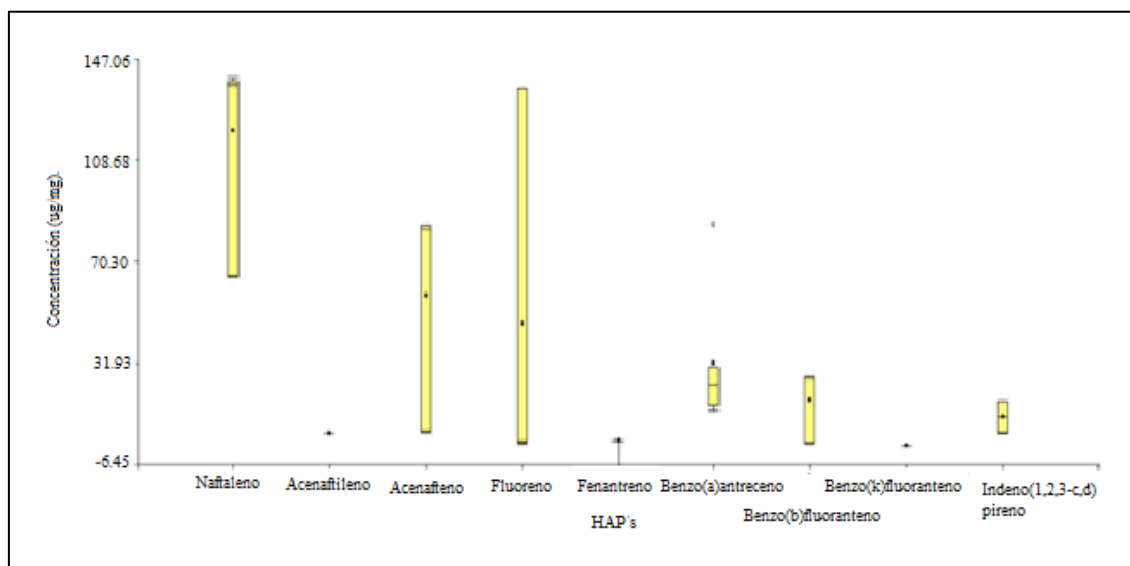


Ilustración 20. Resultados de las muestras de lodo iniciales efectuadas por el laboratorio externo

Los resultados muestran que todas las concentraciones de todos los HAP's analizados están por debajo del límite de detección de 0,625 mg/kg, mostrando una importante uniformidad en las muestras. La ausencia de variaciones significativas en las concentraciones de HAP's entre las muestras sugiere que el lodo examinado está generalmente libre de contaminación por estos compuestos, o bien que cualquier contaminación presente está por debajo de los niveles detectables por las técnicas de análisis utilizadas en el laboratorio externo. Esto es indicativo de una condición estable en el entorno de muestreo respecto a la presencia de HAP's.

En la tabla 10, se presentan los resultados respecto al análisis mediante ANOVA de las concentraciones de HAP's obtenidas en los laboratorios de Ciencias de la Vida, para las muestras de lodo tomadas de los puntos de muestreo. Cada punto fue muestreado en tres ocasiones distintas para asegurar la repetibilidad y precisión de los datos:

Origen	S,C,	gl	CM	F	Sig.
Modelo	56854,29	9	6317,14	10,31	<0,0001
HAP's	55249,48	8	6906,19	11,27	<0,0001
Punto de muestreo	1604,81	1	1604,81	2,62	0,1127
Error	26961,32	44	612,76		
Total	83815,61	33			

a. R al cuadrado = ,498 (R al cuadrado ajustada = ,465)

Tabla 10. Resultados del ANOVA para la concentración de HAP's en muestras de lodo inicial

Los resultados del ANOVA indican que existe diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de HAP's presentes en las muestras de lodo, lo cual indica que distintos HAP's tienen concentraciones variables, lo cual podría estar influenciado por factores como la solubilidad, volatilidad o la degradación microbiológica específica de cada compuesto.

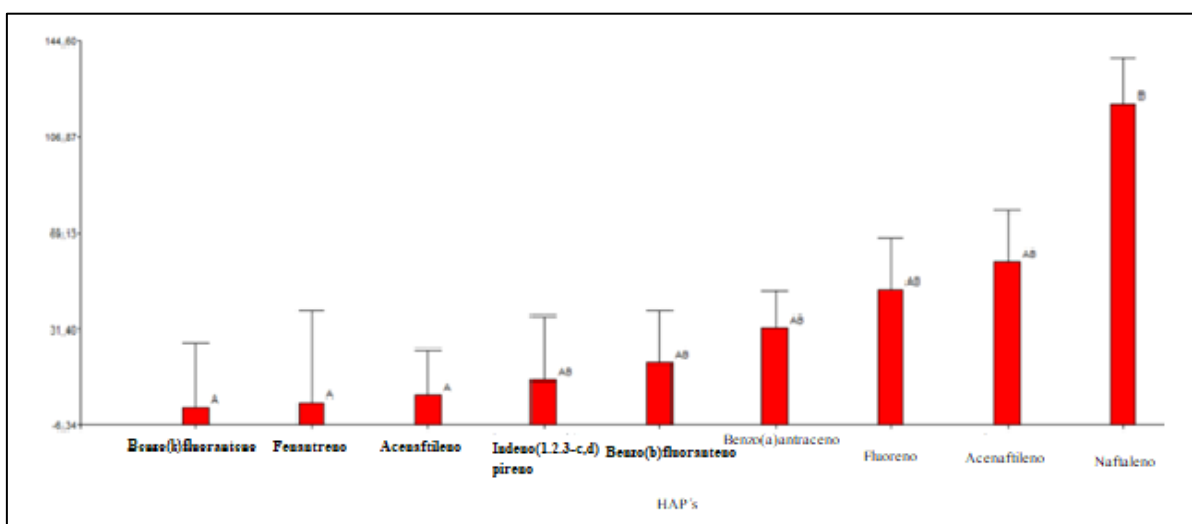


Ilustración 21. Resultados de la prueba Tukey para la concentración de HAP's en muestras de lodo inicial

Mientras que con respecto al punto de muestreo, no presente diferencias significativas, esto indica que el lugar específico de donde se tomaron las muestras no influye significativamente en las concentraciones de HAP's detectadas. Las variaciones en las concentraciones de HAP's parecen ser independientes de la ubicación de muestreo, lo que puede sugerir una distribución homogénea de estos contaminantes en el área estudiada o que las condiciones ambientales y de suelo son similares en los puntos muestreados.

#### 5.1.4. PRUEBAS DE TOLERANCIA

Los resultados obtenidos de las pruebas de tolerancia *in vitro* indicaron que ambas especies fúngicas presentaron un crecimiento adecuado en presencia del lodo contaminado, sin signos de inhibición significativa. Se evaluó el crecimiento de las colonias fúngicas en función de la Escala de Bell, considerando su expansión en el medio de cultivo en comparación con el testigo (crecimiento en PDA sin lodo).

##### **Crecimiento de *Trichoderma citrinoviride* (F11)**

- Testigo: La colonia de *T. citrinoviride* cubrió aproximadamente 9 cm de diámetro en el medio PDA después de 7 días de incubación.
- Tratamiento con lodo contaminado: La colonia mostró un crecimiento de 8,5 cm, con una ligera disminución en la velocidad de expansión, pero sin indicios de inhibición ni alteraciones en la morfología.

##### **Crecimiento de *Trichoderma harzianum* (J1)**

- Testigo: El hongo alcanzó un diámetro de 8,7 cm en PDA después de 7 días.

- Tratamiento con lodo contaminado: Se observó un crecimiento similar al testigo (8,6 cm), con una expansión uniforme en el medio y sin efectos adversos en la esporulación o formación de micelio.

Especie	Condición	Diámetro de Crecimiento (cm)	Clasificación (Escala de Bell)
<i>T. citrinoviride</i> (F11)	Testigo (PDA)	9,0 cm	Clase I
<i>T. citrinoviride</i> (F11)	Con lodo contaminado	8,5 cm	Clase I
<i>T. harzianum</i> (J1)	Testigo (PDA)	8,7 cm	Clase I
<i>T. harzianum</i> (J1)	Con lodo contaminado	8,6 cm	Clase I

Tabla 11. Resultados obtenidos de las pruebas de tolerancia *in vitro*

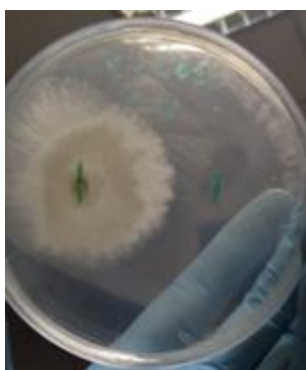


Ilustración 22. Pruebas de tolerancia del aislado fúngico de *T. citrinoviride* Bissett (F11)



Ilustración 23. Pruebas de tolerancia del aislado fúngico de Testigo: *T. harzianum* (J1)



Ilustración 24. Desarrollo adecuado de *T. citrinoviride* Bissett (F11)



Ilustración 25. Desarrollo adecuado de *Trichoderma harzianum* (J1)

*Nota.* Se muestran dos condiciones experimentales: una con las especies de hongos cultivadas solo en medio PDA (Agar Dextrosa de Patata) como testigos, y otra donde, además del hongo, se incorporó una muestra de lodo en el extremo opuesto de la caja de Petri.

Ambas especies mostraron tolerancia total al lodo contaminado, clasificándose en Clase I de la Escala de Bell, lo que indica que pueden colonizar eficientemente el sustrato sin ser inhibidas por los contaminantes presentes. Esto sugiere que son candidatas viables para su uso en procesos de biorremediación en lodos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's).

### 5.1.5. CONFORMACIÓN DE LOS MESOCOSMOS DE SUELO

El desarrollo y manejo de mesocosmos de suelo integrando lodo de lavadora de vehículos, suelo negro y materia orgánica para la biorremediación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) utilizando cepas de *Trichoderma* ha demostrado ser efectivo en crear un sistema controlado que simula condiciones ambientales naturales permitiendo estudiar la interacción entre los microorganismos y los contaminantes.

A través del diseño experimental, que incluyó el control de la humedad, la adición periódica de nutrientes y el manejo adecuado de las condiciones de aereación, se logró optimizar el entorno para el crecimiento y la actividad de las cepas *Trichoderma*, favoreciendo la degradación de los contaminantes.

Este modelo de mesocosmos no solo ha facilitado la evaluación de la capacidad de las cepas de *Trichoderma* para degradar HAP's, sino que también ha permitido obtener datos controlados que son esenciales para validar cualquier estrategia de biorremediación. La metodología de cuarteo utilizada para el muestreo aporta una técnica confiable para el monitoreo y análisis de los contaminantes a lo largo del tiempo, asegurando la precisión y relevancia de los resultados obtenidos.

### 5.1.6. FORMACIÓN DE INÓCULOS FÚNGICOS

La preparación y manejo de inóculos de las cepas de *Trichoderma citrinoviride* Bissett (F11) y *Trichoderma harzianum* (J1), llevada a cabo en los laboratorios de Biología de la Universidad Politécnica Salesiana, demostró ser efectiva para la reproducción y desarrollo de inóculos destinados a la biorremediación de lodos contaminados. Mediante el uso de cajas Petri y matraces de cultivo incubados a condiciones óptimas, se aseguró la maduración uniforme de las cepas, crucial para su eficacia en el campo.

Este cuidadoso control en la reproducción y el trasplante de las cepas fue esencial para mantener la integridad y la actividad biológica de los inóculos, lo que se reflejó en su aplicación exitosa en los mesocosmos del lodo, donde se incorporaron periódicamente tras ser tratados con una solución de dextrosa. Este proceso no solo garantiza la viabilidad de las cepas sino que también optimiza su potencial degradativo, subrayando la importancia de un manejo delicado en la preparación de inóculos para aplicaciones de biorremediación.

### 5.1.7. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO DE BIORREMEDIACIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE HAP´S PRESENTES EN LAS MUESTRAS DE LODOS

A continuación se muestran los resultados obtenidos en la concentración de HAP´s durante el proceso de biorremediación, desde el día 0 hasta el día 90, que corresponde al final del proceso, utilizando *Trichoderma citrinoviride* (identificado como F11) y *Trichoderma harzianum* (identificado como J1). Estos hongos son conocidos por su capacidad para descomponer y transformar contaminantes orgánicos, lo que los hace útiles en procesos de biorremediación.

HAP´s	Dia 0		Dia 90	
	F11	J1	F11	J1

Naphtalene	95,00	62,06	10,86	13,33
Acenaphthylene	5,24	5,24	5,24	5,24
Acenaphthene	17,25	10,41	11,95	6,66
Fluorene	1,31	1,31	1,31	1,31
Phenanthrene	2,62	2,62	2,62	2,62
Anthracene	0,52	0,52	0,52	0,52
Pyrene	2,62	19,96	2,62	2,62
Benz[a]anthracene	1,31	10,75	1,31	1,31
Benzo[b]fluoranthene	28,44	1,31	4,19	1,31
Benzo[k]fluoranthene	0,52	0,52	0,52	0,52
Indeno[1,2,3-c,d]pyrene	5,24	5,24	5,24	5,24

Tabla 12. Resultados de la concentración de HAP's durante el proceso de biorremediación

Los resultados muestran que en general, se observa una importante reducción en las concentraciones de varios HAP's en ambos tratamientos a lo largo del tiempo. Por ejemplo, el Naftaleno en el *Trichoderma citrinoviride* disminuyó de 95,0  $\mu\text{g}/\text{mg}$  a 10,86  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , mientras que en el *Trichoderma harzianum*, también disminuyó, aunque en menor medida. Algunos compuestos, como el Fluoreno y el Benzo[b]fluoranteno, muestran reducciones significativas o mantienen concentraciones muy bajas, indicando la efectividad del proceso de biorremediación. Sin embargo, hay excepciones como el Benzo[k]fluoranteno con el *Trichoderma harzianum*, que muestra un aumento inusual a 14055,83  $\mu\text{g}/\text{mg}$  en el Día 90, lo que podría indicar una contaminación específica o una degradación diferencial de otros compuestos que contribuyen a su aumento.

Los resultados obtenidos sugieren que las concentraciones de HAP's en las muestras de lodo están por debajo de los límites de detección, y los procedimientos experimentales utilizados son adecuados para la detección y análisis de estos compuestos, por lo que, la biorremediación con *Trichoderma citrinoviride* y *Trichoderma harzianum*. es una estrategia viable para el manejo de estos lodos.

No obstante, el *Trichoderma citrinoviride* demostró ser el hongo más efectivo para la biorremediación de HAP's, proporcionando reducciones consistentes y significativas en las concentraciones de varios HAP's sin los incrementos problemáticos observados con *T. harzianum*, lo cual lo hace una opción más viable para futuras aplicaciones en biorremediación de lodos contaminados con HAP's.

Para determinar si existían diferencias significativas entre la concentración de HAP's durante el proceso de biorremediación, se efectuó un Análisis de Varianza (ANOVA), obteniendo los siguientes resultados:

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	230195601837,902 <sup>a</sup>	6	38365933639,650	1,47	0,2311
Tratamiento	6529551598,730	2	3264775799,365	,943	0,2311
Error	1420202162009,078	410	3463907712,217		
Total	1650397763846,981	416			

a. R al cuadrado = ,139 (R al cuadrado ajustada = ,127)

Tabla 13. Resultados del ANOVA de la concentración de HAP's en los procesos de tratamiento

Los resultados del ANOVA indican que no existe diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de HAP's presentes entre los diferentes tratamientos (testigo, *Trichoderma citrinoviride* y *Trichoderma harzianum*).

La falta de diferencias significativas en el ANOVA sugiere que ni *Trichoderma citrinoviride* ni *Trichoderma harzianum* son superiores al control en términos de reducir las concentraciones de HAP's en las condiciones específicas del estudio, lo cual no necesariamente implica que los hongos no tengan un efecto sobre los HAP's, pero sugiere que bajo las condiciones experimentales y con las cepas específicas utilizadas, no se demostró una eficacia diferencial clara.

## 6. CONCLUSIONES

El estudio realizado sobre la biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) en lodos residuales de una lavadora de vehículos, muestra los siguientes hallazgos:

- Los autolavados, identificados como fuentes significativas de contaminantes ambientales en estudios revisados, contribuyen a la contaminación por hidrocarburos, metales pesados, solventes y emulsificantes encontrados en sus aguas residuales. Estos residuos, si no son gestionados adecuadamente, tienen el potencial de infiltrarse en los sistemas de agua locales, afectando gravemente la calidad del agua y la vida acuática. La acumulación de sedimentos y lodos en estas instalaciones revela altas concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), subrayando la necesidad de implementar prácticas de gestión y tratamiento más rigurosas.
- El muestreo en los puntos de descarga dentro de las trampas de lodos, grasas y aceites demostró ser eficiente, proporcionando muestras sólidas representativas de diversas secciones del sistema.
- Las cepas del género *Trichoderma* mostraron una adaptación importante y un crecimiento efectivo en medios contaminados con HAP's, cubriendo completamente el medio de cultivo. Esto indica su potencial para ser utilizadas en la biorremediación de los lodos generados en lavadoras de vehículos, debido a su capacidad para desarrollarse en condiciones adversas.
- Los resultados muestran variaciones en las concentraciones de HAP's en el aceite motor usado en comparación con el nuevo, destacando un aumento en compuestos como el Naftaleno y el Fluoreno en el aceite usado, lo que sugiere un enriquecimiento de estos compuestos durante la operación del motor. Sin embargo, otros HAP's como Benzo[b]fluoranteno y Benzo[k]fluoranteno no fueron detectados en algunas muestras, posiblemente debido a limitaciones en el método de muestreo o la particularidad de su comportamiento químico en el motor.

- En cuanto al lodo, las concentraciones de todos los HAP's analizados fueron consistentemente bajas y en muchos casos, por debajo del límite de detección, sugiriendo que el material de partida tenía una baja carga contaminante inicial o que los métodos de medición no fueron suficientemente sensibles para detectar concentraciones más bajas. El estudio también reveló que, a lo largo de un tratamiento de biorremediación de 90 días utilizando las cepas de *Trichoderma citrinoviride* (F11) y *Trichoderma harzianum* (J1), se observó una reducción en la concentración de varios HAP's, especialmente Naftaleno y Fluoreno, lo cual demuestra la capacidad de estas cepas para degradar efectivamente estos compuestos.
- Sin embargo, la aparición de altas concentraciones de Benzo[k]fluoranteno en uno de los tratamientos sugiere una posible acumulación o liberación secundaria de este compuesto, lo que podría requerir estrategias de manejo adicional en prácticas de biorremediación futuras. El análisis estadístico ANOVA confirmó que, aunque existen diferencias significativas en las concentraciones de HAP's entre los tipos de aceite analizados, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de biorremediación, indicando que ni *Trichoderma citrinoviride* ni *Trichoderma harzianum* ofrecieron una ventaja estadísticamente significativa sobre el control en las condiciones del estudio.
- La implementación de mesocosmos de suelo integrando lodo de lavadora, suelo negro y materia orgánica resultó ser una estrategia exitosa para simular condiciones ambientales controladas. Este modelo facilitó la evaluación de la efectividad de las cepas de *Trichoderma* en la descomposición de HAP's. Los controles de humedad, nutrientes y aireación fueron fundamentales para optimizar las condiciones del entorno, favoreciendo así la actividad biológica y la degradación de los contaminantes.

## 7. REFERENCIAS

- Afzal, M., Arslan, M., Younus, S., Islam, E., Tauseef, M., & Iqbal, S. (2024). A nature-based closed-loop wastewater treatment system at vehicle-washing facilities: From linear to circular economy. *National Institute for Biotechnology and Genetic Engineering College*. [https://www.cell.com/iscience/pdf/S2589-0042\(24\)00582-0.pdf](https://www.cell.com/iscience/pdf/S2589-0042(24)00582-0.pdf)
- Barathi, S., Gandhimathi, G., Sabapathi, N., Aruljothi, K., Lee, J., & Kandasamy, S. (2023). Recent trends in polycyclic aromatic hydrocarbons pollution distribution and counteracting bio-remediation strategies. *Chemosphere*. doi:10.1016/j.chemosphere.2023.139396.
- Bharatkumar, A., Shaikh, S., Jain, K., Desai, C., & Madamwa, D. (2020). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches. *Front Microbiol*, 11(562813). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7674206/>
- Bermeo Rojas, Y. E. (2018). Biodegradación de residuos procedentes de una línea de producción de laminados empleando *Trichoderma sp.* [HYPERLINK "http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15742"](http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15742) \h <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15742>
- Fallahi, M., Sarempour, M., & Mirzadi, A. (2023). Potential biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and petroleum hydrocarbons by indigenous fungi recovered from crude oil-contaminated soil in Iran. *Scientific Reports*, 13(22153). <https://www.nature.com/articles/s41598-023-49630-z>
- Kashi, G., Younesi, S., Heidary, A., Akbarishahabi, Z., Kavianpour, B., & Rezaei, R. (2021). Carwash wastewater treatment using the chemical processes. *Water Sci. Technol.*, 84, 16–26. <https://iwaponline.com/wst/article/84/1/16/82355/Carwash-wastewater-treatment-using-the-chemical>
- Kazembeigi, F., Bayad, S., Yousefi, A., Doraghi, M., & Parsehf, I. (2023). Techno-environmental study on the consequences of carwash wastewater and its

- management methods. *Heliyon*, 9(9).  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10559047/>
- Mojiri, A., Zhou, J., Ohashi, A., Ozaki, N., & Kindaichi, T. (2019). Comprehensive review of polycyclic aromatic hydrocarbons in water sources, their effects and treatments. *Sci. Total Environ.*, 133971. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.133971
- Monney, I., Amponsah, E., & Buamah, R. (2020). Clean vehicles, polluted waters: empirical estimates of water consumption and pollution loads of the carwash industry. *Heliyon*. 2020, 6(5).  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7226662/>
- Oklahoma Department of Environmental. (2022). (*Fact Sheets\ECLS\Car Wash Sludge*.  
<https://www.deq.ok.gov/wp-content/uploads/deqmainresources/CarWashSludge.pdf>
- Qamar, Z., Khan, S., Khan, A., Nawab, M. A., & M. Waqas. (2017). Appraisal, source apportionment and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in vehicle-wash wastewater. *Pak. Sci. Total Environ*, 605, 106–113.
- Sanabria Velázquez, A. D., 2020. Evaluación de aislados de *Trichoderma spp.* nativos del Paraguay para el control de *Colletotrichum spp.* causante de la antracnosis en frutilla. *Investigación Agraria*, 22(1), pp. 53-62.
- Sarmadiaz, M., Zareia, A., Ghahrchic, M., Sepehrniad, B., Meshkiniane, A., Moeine, H., . . . Bazrafshan, E. (2021). Carwash wastewater characteristics - a systematic review study. *Desalination and Water Treatment*, 225, 112–148.  
[https://www.deswater.com/DWT\\_articles/vol\\_225\\_papers/225\\_2021\\_112.pdf](https://www.deswater.com/DWT_articles/vol_225_papers/225_2021_112.pdf)
- Stamatiu, K., Alarcón, A., Ferrera, R., Nava, C., Sánchez, J., Cruz, J., & Castillo, M. (2015). Tolerancia de hongos filamentosos a endosulfán, clorpirifós y clorotalonil en condiciones in vitro. *Rev. Int. Contam. Ambie*, 31(1), 23–37.
- Sharma, u., Bishal, G., & Devi, R. (2020). Assessing the impacts of vehicle wash wastewater on surface water quality through physico-chemical and benthic macroinvertebrates analyses. *Water Science*, 34(1), 39-49.  
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/11104929.2020.1731136?role=tab&tab=permissions&scroll=top>

The government of New Hampshire. (2020). *Car Washes and Water Quality*.  
<https://www.des.nh.gov/sites/g/files/ehbemt341/files/documents/2020-01/wmb-14.pdf>

Torkashvand, J., Pasalari, H., Gholami, M., Younesi, S., & Farzadkia, M. O. (2022). On-site carwash wastewater treatment and reuse: a systematic review. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 102, 3613–3627.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1474706510000379>

## 8. ANEXOS

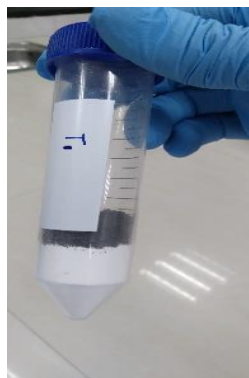
### Anexo 1 Muestras de los lodos iniciales



## Anexo2 Transferencia de la solución sobrenadante



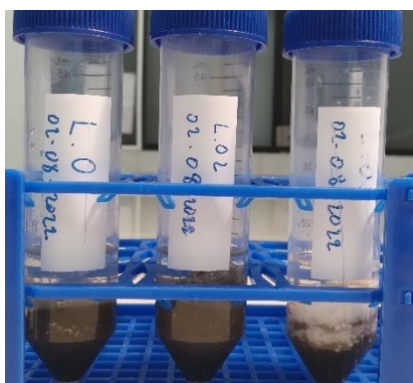
Peso de la muestra



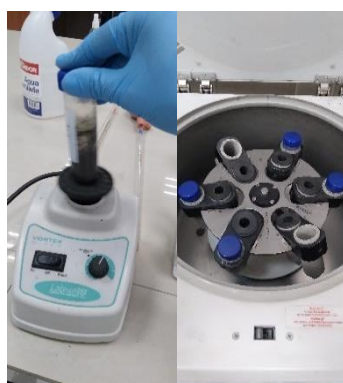
Adición de reactivos



Adición de Acetonitrilo



Muestras listas para agitación



Agitación y centrifugado



Solución sobrenadante

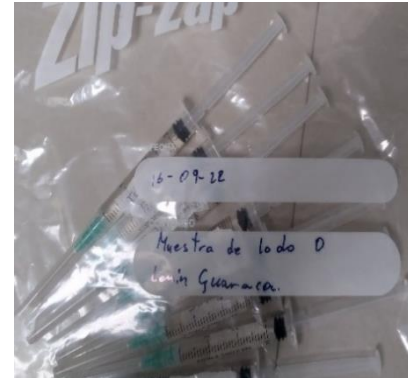
**Anexo 3** Extracción de la solución y preparación de la misma para el proceso de filtración y análisis



Extracción de sobrenadante



Agitación y centrifugado de muestra



Preparación de muestra en jeringa