

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

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

**Tesis previa a la obtención del Título de: INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA
DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA
DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE TOLERANCIA A
HIDROCARBUROS Y POTENCIAL DE FITORREMEDIACIÓN EN CUATRO
ESPECIES VEGETALES NATIVAS PROCEDENTES DEL SECTOR BAEZA-
EL CHACO, ECUADOR.**

**AUTORA:
MIRIAM JANELA BÁRCENAS CALERO**

**DIRECTOR:
ÁNGEL PATRICIO YÁNEZ MORETTA**

Quito, Enero de 2012

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Los conceptos desarrollados, análisis realizados y las conclusiones del presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Quito, Enero de 2012

Miriam Janela Bárcenas Calero

DEDICATORIA

El presente documento está dedicado a mis padres, que me apoyaron en todo momento para el logro de mis objetivos.

Mily B.

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco a la Universidad Politécnica Salesiana por su apoyo al Proyecto de Investigación Formativa Preg/007, “Determinación de los niveles de tolerancia a hidrocarburos y potencial de fitorremediación en cuatro especies vegetales nativas procedentes del sector Baeza-El Chaco, Ecuador”.
- A los laboratorios del CIVABI, de AGROCALIDAD y CENTROCESAL por haberme permitido realizar los análisis requeridos para alcanzar los objetivos planteados en la presente investigación.
- A mi Director de Tesis, Ms. Patricio Yáñez por todo lo que aprendí con él, su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza y afecto, fundamentales para la concreción de este trabajo.
- Al los docentes y autoridades de la carrera Paco Noriega, Cristian Larenas, Pablo Coba, Laura Huachi, Diana Calero y Ma. Elena Maldonado por su apoyo científico y por sus valiosas sugerencias durante el desarrollo de este trabajo.
- A quienes colaboraron como asistentes de campo en la comunidad de San Luis, Roberta Andi y Pedro Andi.
- A mis padres por su gran comprensión, apoyo y constante estímulo.
- A Pablo Inga, Vanesa Fajardo, Diego Calderón, Ronal Villareal, Sandra Alvear, Daniela Espinosa y Patricia Chávez amigos que ayudaron de forma directa o indirecta en el desarrollo del presente trabajo.

CONTENIDO

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
CONTENIDO.....	iv
Lista de Figuras	vii
Lista de Cuadros	viii
Lista de Anexos	x
Resumen	xi
Abstract.....	xii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Justificación</i>	3
1.2. <i>Objetivos e Hipótesis</i>	5
1.2.1. <i>Objetivo General</i> -----	5
1.2.2. <i>Objetivos Específicos</i> -----	5
1.2.3. <i>Hipótesis</i> -----	6
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	7
2.1. EL PETRÓLEO	7
2.1.1. <i>Composición del Crudo de Petróleo</i> -----	7
2.1.2. <i>Reseña histórica de la Extracción de Petróleo en el Ecuador</i> -----	9
2.1.3. <i>Producción y Potencial petrolífero</i> -----	11
2.1.4. <i>Derrames de Petróleo en Ecuador</i> -----	11
2.1.5. <i>Contaminación y consecuencias de los derrames de Petróleo en Ecuador</i> -----	12
2.2. FITORREMEDIACIÓN	13
2.2.1. <i>Definición</i> -----	13
2.2.2. <i>Inicio y Desarrollo de la Fitorremediación</i> -----	14
2.2.3. <i>Perspectivas de desarrollo para el futuro de la fitorremediación</i> -----	15
2.2.4. <i>Ventajas de la Fitorremediación</i> -----	16
2.2.5. <i>Desventajas de la Fitorremediación</i> -----	17
2.2.6. <i>Clasificación general de la Fitorremediación</i> -----	18
2.2.7. <i>Características principales de la Fitorremediación</i> -----	19
2.2.8. <i>Mecanismos de la Fitorremediación</i> -----	19
2.2.9. <i>Interacciones planta-microorganismos</i> -----	23

2.2.10. Fases de Fitorremediación en una Planta Fitorremediadora-----	23
2.2.11. Plantas más utilizadas en Fitorremediación -----	24
2.2.12. Fitorremediación de contaminantes orgánicos-----	25
2.2.13. Alternativas para la Obtención de Especies Útiles para Fitorremediación de Derrames de Hidrocarburos -----	27
2.2.14. Eliminación del Material Vegetal-----	28
2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LAS PLANTAS UTILIZADAS.....	29
2.3.1. <i>Mimosa polydactyla</i> Humb & Boonpl. ex Will-----	29
2.3.2. <i>Ludwigia peruviana</i> (L.) H. Hara -----	32
2.3.3. <i>Tessaria integrifolia</i> Ruiz & Pav. -----	34
2.3.4. <i>Verbena litoralis</i> Kunth -----	37
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.1. ÁREA DE ESTUDIO Y SELECCIÓN DE ESPECIES	40
3.2. IMPLEMENTACIÓN DE TRATAMIENTOS DE FITOREMEDICIÓN EN EL SITIO DE TRABAJO	41
3.2.1. Determinación sistemática de posibles especies vegetales bio-rremediadoras---	41
3.2.2. Características del diseño experimental -----	41
3.2.3. Obtención del sustrato-----	42
3.2.4. Obtención del contaminante (petróleo) -----	43
3.2.5. Preparación del sustrato-----	43
3.2.6. Recolección de especies vegetales seleccionadas como posibles individuos bio-rremediadores -----	43
3.2.7. Trasplante y adaptabilidad de individuos vegetales posibles bio-remediadores a los Tratamientos de Fitorremediación-----	44
3.3. MÉTODOS UTILIZADOS PARA VERIFICAR LA DINÁMICA DE LA FITOREMEDICIÓN.....	44
3. 3.1. Monitoreo y control de individuos vegetales -----	44
3.3.2. Cualificación de la producción y crecimiento de raíces de las diferentes especies sobre suelos con y sin presencia de HC -----	45
3.3.3. Determinación de características físico-químicas del suelo al inicio y al final de la investigación-----	45
a) Determinación de pH.	47
b) Determinación de Humedad.....	48
c) Determinación de Materia orgánica.....	49
d) Determinación del grado de contaminación del suelo por TPHs (Hidrocarburos totales del petróleo).....	50

e) <i>Determinación de Textura</i>	51
f) <i>Determinación de color</i>	52
g) <i>Determinación de Nitrógeno</i>	53
h) <i>Determinación de Fósforo asimilable</i>	54
i) <i>Determinación de Potasio</i>	54
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS OBTENIDOS EN EL LABORATORIO Y EN CAMPO.	54
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
4.1. <i>Determinación y obtención de individuos potencialmente bio-remediadores</i>	56
4.2. <i>Instalación del Sitio de trabajo</i>	58
4.3. <i>Dinámica de Fitorremediación</i>	59
<i>Ludwigia peruviana</i>	60
<i>Mimosa polydactyla</i> -----	63
<i>Tessaria integrifolia</i> -----	66
<i>Verbena litoralis</i> -----	71
4.4. <i>Consideraciones generales</i>	76
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	78
REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍA	80
ANEXOS	94

Lista de Figuras

Figura 1. Publicaciones por fitorremediación por año.	15
Figura 2. Mecanismos de la fitorremediación (se indica la zona de la planta en donde ocurre el proceso).	22
Figura 3. Hoja de <i>Mimosa polydactyla</i>	31
Figura 4. Mapa de la Hoya del Quijos y de la ubicación de la comunidad de San Luis.	40
Figura 5. Medianas de concentración de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) al final del experimento en suelos contaminados y no contaminados, tratados con <i>Ludwigia peruviana</i>	62
Figura 6. Medianas de concentración de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) al final del experimento en suelos contaminados y no contaminados, tratados con <i>Mimosa polydactyla</i>	65
Figura 7. Medianas de concentración de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) al final del experimento en suelos contaminados y no contaminados, tratados con <i>Tessaria integrifolia</i>	69
Figura 8. Tasas de degradación (%) de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) al final del experimento en suelos contaminados con y sin fertilizante de los tratamientos identificados con potencial de fitorremediación, tratados con <i>Tessaria integrifolia</i>	70
Figura 9. Medianas de concentración de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) al final del experimento en suelos contaminados y no contaminados, tratados con <i>Verbena litoralis</i>	74
Figura 10. Tasas de degradación (%) de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) al final del experimento en suelos contaminados con y sin fertilizante de los tratamientos identificados con potencial de fitorremediación, tratados con <i>Verbena litoralis</i>	75

Lista de Cuadros

Cuadro 1. La fitorremediación es económicamente competitiva respecto de otras alternativas de remediación.	17
Cuadro 2. Taxonomía de <i>Mimosa polydactyla</i>	29
Cuadro 3. Taxonomía de <i>Ludwigia peruviana</i>	32
Cuadro 4. Taxonomía de <i>Tessaria integrifolia</i>	35
Cuadro 5. Taxonomía de <i>Verbena litoralis</i>	37
Cuadro 6. Diseño experimental aplicado (a)	42
Cuadro 7. Detalle de los métodos utilizados en la caracterización de los suelos.	46
Cuadro 8. Criterios de evaluación de un suelo con respecto a su pH.	48
Cuadro 9. Límites permisibles de hidrocarburos en suelos.	51
Cuadro 10. Tamaño de las partículas y características de las fracciones de arena, limo y arcilla en la clasificación del departamento de los Estados Unidos (U.S.D.A.).	52
Cuadro 11. Sitios de trabajo inicial y especies vegetales potencialmente bio-remediadoras.	57
Cuadro 12. Reporte de adaptabilidad al trasplante de los individuos vegetales en los tratamientos establecidos en el diseño experimental.	58
Cuadro 13. Resultados de los análisis en el suelo utilizado (a)	59
Cuadro 14. Resultados del Análisis de Kolmogorov-Smirnov para la comparación entre los vectores de crecimiento (altura de la planta, cm) de <i>Ludwigia peruviana</i> en los diferentes tratamientos.	60
Cuadro 15. Resultados del Análisis de Kolmogorov-Smirnov para la comparación entre los vectores de desarrollo de la biomasa aérea (No. de hojas) de <i>Ludwigia peruviana</i> en los diferentes tratamientos.	61
Cuadro 16. Resultados del Análisis de Kolmogorov-Smirnov para la comparación entre los vectores de desarrollo de la biomasa aérea (No. de hojas) de <i>Mimosa polydactyla</i> en los diferentes tratamientos.	64
Cuadro 17. Resultados del Análisis de Kolmogorov-Smirnov para la comparación entre los vectores de crecimiento (altura de las plantas, cm) de <i>Tessaria integrifolia</i> en los diferentes tratamientos.	67
Cuadro 18. Resultados del Análisis de Kolmogorov-Smirnov para la comparación entre los vectores de desarrollo de la biomasa aérea (No. de hojas) de <i>Tessaria integrifolia</i> en los diferentes tratamientos.	68
Cuadro 19. Resultados de la Prueba de Kruskal-Wallis en la comparación de los valores de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) en suelo tratado con <i>Tessaria integrifolia</i>	70

Cuadro 20. Resultados del Análisis de Kolmogorov-Smirnov para la comparación entre los vectores de crecimiento (altura de las plantas, cm) de <i>Verbena litoralis</i> en los diferentes tratamientos.....	72
Cuadro 21. Resultados del Análisis de Kolmogorov-Smirnov para la comparación entre los vectores de desarrollo de la biomasa aérea (No. de hojas) de <i>Verbena litoralis</i> en los diferentes tratamientos.....	73
Cuadro 22. Resultados de la Prueba de Kruskal-Wallis en la comparación de los valores de TPHs en suelo tratado con <i>Verbena litoralis</i>	75

Lista de Anexos

Anexo 1. SALIDAS DE CAMPO	94
Anexo 2. PLANTAS MUESTREADAS EN LAS VISITAS DE CAMPO.	97
Anexo 3. DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL SUELO AL INICIO DE LA INVESTIGACIÓN	98
Anexo 4. ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS MEDIANTE MÉTODO DE SOXHLET EN EL CIVABI-UPS AL INICIO DE LA INVESTIGACIÓN	99
Anexo 5. PREPARACIÓN DEL SUSTRATO CON LAS CONCENTRACIONES DETERMINADAS DE PETRÓLEO.....	100
Anexo 6. INSTALACIÓN DEL INVERNADERO	100
Anexo 7. RECOLECCIÓN ESPECIES SELECCIONADAS COMO POSIBLES FITORREMEDIADORAS.....	101
Anexo 8. TRASPLANTE Y ROTULACIÓN DE PLANTAS A LOS TRATAMIENTOS DE FITORREMEDIACIÓN	101
Anexo 9. MONITOREO Y CONTROL DE INDIVIDUOS VEGETALES BIO-REMEDIADORES.....	102
Anexo 10. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE SUELOS PARA ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS AL FINAL DE LA INVESTIGACIÓN	105
Anexo 11. DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL SUELO AL FINAL DE LA INVESTIGACIÓN	107
Anexo 12. ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS MEDIANTE MÉTODO DE GRAVIMÉTRICO	112
Anexo 13. DATOS REGISTRADOS DURANTE 5 MESES DEL ENSAYO DE FITORREMEDIACIÓN.....	115
Anexo 14. RESULTADOS DE RESULTADOS DE ANÁLISIS EDÁFICOS FINALES	119

Resumen

Para Ecuador, el petróleo es la principal fuente del PIB; la producción y las fases de la actividad petrolera afectan al ambiente, pues conllevan riesgos de contaminación por derrames; siendo ineludible remediar estos daños de alguna manera. La fitorremediación se presenta como una tecnología alternativa de bajo costo para limpiar suelos contaminados; en el presente trabajo se evalúan los niveles de tolerancia y potencial de fitorremediación de *Ludwigia peruviana*, *Mimosa polydactyla*, *Tessaria integrifolia* y *Verbena litoralis* en suelo contaminado con petróleo, mediante comparación del cambio (desaparición cuantitativa) en el contenido de la fracción pesada de hidrocarburos en tales suelos por método gravimétrico. El estudio se realizó en un ambiente controlado de lluvia implementado en la comunidad de San Luis, Cantón El Chaco, Provincia de Napo y en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana-Quito. Se pesaron 4 kg de suelo por cada maceta (bolsa plástica) y se homogenizó con 120 y 240 g de petróleo para una contaminación que representa el 3 y 6%, respectivamente, con un testigo por especie sin petróleo y otro con petróleo y sin planta. El trasplante de las plantas silvestres recolectadas se realizó a los 14 días después de contaminado el suelo con petróleo. El diseño experimental fue de cuatro repeticiones por tratamiento y seis tratamientos para cada especie. Se encontró que los mejores resultados de actividad fitorremediadora en 5 meses de tratamiento fueron para *Tessaria integrifolia* y *Verbena litoralis* a bajas concentraciones de petróleo (3%).

Palabras clave: fitorremediación, tolerancia a contaminación, hidrocarburos, suelo y especies vegetales nativas.

Abstract

In Ecuador, petroleum is the main source of income; the production and phases of oil industry can affect the environment, mainly through pollution from spills, being necessary remedy this damage somehow. Phytoremediation is presented as a low cost alternative technology for cleaning contaminated soil. The aim of this were to evaluate the levels of tolerance and phytoremediation potential of *Ludwigia peruviana*, *Mimosa polydactyla*, *Verbena litoralis* and *Tessaria integrifolia* in soil contaminated with petoleum, by comparing the change (quantitative disappearance) in the heavy hydrocarbon fraction content in such soils by gravimetric method. The study was carried out in a rain controlled environment implemented in community of San Luis, town El Chaco, Napo Province and in the laboratories of the Universidad Politécnica Salesiana-Quito. 4 kg of soil were weighed per pot (plastic bags) and homogenized with 120 and 240 g of oil contamination of 3 and 6%, respectively, leaving a control treatment without oil by species and one with oil but without plant. Transplanting wild plants was 14 days after soil contamination with different concentrations of petroleum. The experimental design included four replicates and six treatments for each species. After 5 months of investigation, the results showed that *Tessaria integrifolia* and *Verbena litoralis* have the best phytoremediation potential at low concentrations of oil (3%). After 5 months of investigation, the results showed that *Tessaria integrifolia* and *Verbena litoralis* have the best phytoremediation potential at low concentrations of oil (3%).

Keywords: phytoremediation, tolerance to pollution, petroleum, soil, native plant species.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El petróleo es la principal fuente de ingresos de Ecuador y su producto de mayor exportación (Jones, 2010); con una producción promedio de 475173 barriles de crudo por día, de los cuales un 34% son extraídos por las empresas privadas, mientras que el 66% restante es generado por las empresas públicas (Silva, 2010).

Ecuador es un país megabiodiverso; sus bosques y otros ecosistemas contienen una altísima biodiversidad, pero la producción de petróleo y las diferentes las fases de la actividad petrolera eventualmente la afectan, principalmente por la ocurrencia de contaminación por derrames de petróleo (Vogliano, 2009). Desafortunadamente, en general las empresas que se han venido encargando de la extracción y gestión del petróleo no han cumplido a cabalidad con las respectivas normas de prevención y corrección de contaminación ambiental ocasionada por derrames.

Es así, que considerando los efectos que provocan estos eventos para la salud ambiental y humana, en el presente trabajo se evalúan los niveles de tolerancia y potencial de fitorremediación de cuatro especies nativas (seleccionadas por determinación sistémica en sitios contaminados por ocurrencia de derrames): *Ludwigia peruviana*, *Mimosa polydactyla*, *Tessaria integrifolia* y *Verbena litoralis*, en suelo con una contaminación simulada de petróleo al 3 y 6%, en presencia y ausencia de fertilizante.

La presente investigación se basó en el principio en el que se fundamenta la técnica de la biorremediación, el cual indica que la naturaleza es capaz de subsanar incluso los peores daños ambientales ocasionados por hidrocarburos del petróleo, empleando para ello su capacidad de regeneración, siempre y cuando se le dé el tiempo adecuado para hacerlo (Mendoza y Gómez, 2002). Según Ibáñez (2006), la fitorremediación es una rama de la biorremediación, que utiliza plantas para llevar a cabo acciones de eliminación o transformación de varios contaminantes.

Ortiz (2004) enuncia que entre los contaminantes que pueden ser biorremediados se pueden incluir a algunos metales, plaguicidas, solventes, explosivos, petróleo,

hidrocarburos aromáticos policíclicos y lixiviados en vertederos. Además, es una técnica muy aventajada con respecto a técnicas de remediación convencionales, pues sus costos son bajos, contribuye a la estabilización del suelo, así como a la mejora del paisaje, reduce los lixiviados de agua y el transporte de los contaminantes inorgánicos del suelo, aunque evidentemente el tiempo requerido para llevar a cabo este tipo de remediación es más largo que el utilizado por otras tecnologías (Ibáñez, 2006).

El primer paso para llevar a cabo el presente trabajo fue seleccionar las cuatro especies vegetales nativas de la región andino-amazónica, en el sector Baeza-El Chaco, que mostraron tolerancia a derrames de petróleo, guiando esta afirmación a la presencia persistente de estas especies en zonas de derrames reportados, mediante observación directa aplicada a salidas de campo.

Se instaló un ambiente controlado de lluvia (sitio de trabajo) en la comunidad de San Luis, Cantón El Chaco, Provincia de Napo, con la finalidad de comprobar la tolerancia aparente observada de estas cuatro especies en tales derrames, mediante evaluación del crecimiento de las mismas con un monitoreo periódico; se adaptaron los tratamientos establecidos a condiciones simuladas de derrames a dos concentraciones de petróleo en el suelo, la primera y más baja al 3% y una mayor al 6%; además se comparó la evolución de estas especies en presencia y ausencia de un fertilizante orgánico.

En el sitio de trabajo se logró obtener condiciones ambientales semi-controladas, eliminando interferencias (excesos de agua por lluvias, luz solar exagerada, etc.) que pudieran alterar los resultados de la investigación.

Luego de 5 meses de tratamiento, en los laboratorios del CIVABI de la UPS-Quito, se realizaron análisis de algunos parámetros edáficos: humedad, pH, textura, color, materia orgánica y nutrientes esenciales en el crecimiento de plantas; se determinó la concentración cuantitativa de la fracción pesada de Hidrocarburos totales de petróleo, análisis realizados con el objetivo de verificar la ocurrencia y la intensidad de la actividad fitorremediadora de cada especie, mediante método gravimétrico aplicado al sustrato (suelo contaminado). Finalmente mediante análisis estadísticos se determinó la actividad fitorremediadora de cada especie y cuál de ellas fue la más eficaz.

1.1. Justificación

“El petróleo se produce en cantidades comerciales en virtualmente toda masa de tierra de tamaño significativo en nuestro planeta”¹. Este producto constituye la fuente de energía más importante con una participación de casi el 40% en la demanda mundial de energía; aunque sus reservas estimadas en 1997, sólo alcanzan para cubrir los próximos 43 años (Dubois, 2005). Consecuentemente a estas afirmaciones, es que en todo el mundo existe un grave problema de contaminación de origen antrópico, debido a un mal manejo de materiales y residuos peligrosos, provocando el deterioro de suelos y aguas, disminuyendo la calidad de vida a nivel global; ocasionando el deterioro progresivo de la calidad del ambiente y generando una amenaza real a la salud pública, así como la extinción de gran cantidad de especies vegetales y animales (Benavides *et al.* 2006).

La extracción y el manejo del petróleo en los países productores de hidrocarburos en América Latina, donde se incluye al Ecuador, constituye una de las más severas contaminaciones (Mendoza y Gómez, 2002). Una de las principales causas de esta contaminación en Ecuador, es que las empresas que se han venido encargando de la extracción y gestión del petróleo no han cumplido con las respectivas normas de prevención y corrección de contaminación ambiental ocasionada por derrames, entre otros; lo cual es irrelevante ya que, la producción y todas las fases de la actividad petrolera, conllevan a altos riesgos por contaminación de derrames de petróleo, así se registran en el año 2008 hasta el mes de septiembre 117 derrames, lo que revela que un incidente de este tipo se produjo cada dos días, en promedio, según datos de Petroecuador (Guaranda, 2011). Convirtiéndose en un problema muy grave para la salud ambiental y humana por los efectos que provoca.

Si bien a nivel mundial se ha tratado de solucionar este problema aplicando tecnologías como el proceso de incineración, la desorción térmica, extracción con vapor o la vitrificación, pero estas resultan demasiado costosas o ecológicamente incompatibles para considerarse como una solución viable, según menciona Mendoza y Gómez. (2002). Sin embargo, la mayor problemática actual de los sitios

¹ Douglas, M. 1998. Energía: Tecnología del Petróleo. Tomo 2. Publicaciones Marcombo S.A. México DF-Barcelona.

contaminados con hidrocarburos, es el grado de dificultad y del enorme costo económico de la remediación de suelos, cuerpos de agua y atmósfera contaminados (Schmidt, 2000; citado en Benavides *et al.* 2006).

Un punto positivo dentro de toda esta problemática de contaminación es que, la naturaleza es capaz de subsanar incluso los peores daños ambientales ocasionados por hidrocarburos del petróleo, empleando para ello su capacidad de regeneración, siempre y cuando se le dé el tiempo adecuado para hacerlo; a partir de este principio se fundamenta la técnica de biorremediación, usada mundialmente como una alternativa ecológica compatible y de bajo costo en la remediación de suelos contaminados por hidrocarburos (Mendoza y Gómez, 2002).

La biorremediación se ha convertido en una de las tecnologías a las que se dirige en la actualidad el mayor interés. Dentro de la biorremediación se halla una rama muy importante, la *fitorremediación* que es la utilización de plantas para llevar a cabo acciones de eliminación o transformación de contaminantes, cuya ventaja se basa en los bajos costos, su contribución a la estabilización del suelo, así como a la mejora del paisaje, y reduce los lixiviados de agua y el transporte de los contaminantes inorgánicos del suelo, aunque evidentemente el tiempo requerido para llevar a cabo este tipo de remediación es más largo que el utilizado en otras tecnologías (Ibáñez, 2006).

Algunos ejemplos que se pueden citar de fitorremediación son los casos que menciona López *et al.* (2005) en la Revista Internacional de Contaminación Ambiental como: la biodegradación del fenantreno por raíces de avena y por comunidades nativas del suelo; o el caso, en el que investigaron la capacidad de degradación y la composición de las comunidades microbianas durante la fitoestimulación en la raíz de *Festuca arundinacea* expuesta a hidrocarburos de petróleo, donde encontraron que la máxima tasa de degradación fue de 38 mg de hidrocarburos/kg mes; en otro trabajo demostraron la biodegradación de varios contaminantes se intensificó debido al crecimiento de pastos en los suelos contaminados con hidrocarburos.

Además, de estos beneficios, es preciso valorar la contribución de esta técnica a la atenuación del proceso de calentamiento global del Planeta, al aprovechar la capacidad

de retención del CO₂ atmosférico de las plantas y el suelo, reduciendo las pérdidas de carbono orgánico del suelo y aumentando la producción de biomasa (Cortés, 2007), además, las plantas producen hidratos de carbono y liberan oxígeno (Dubois, 2005).

Tomando en cuenta todas las bondades de la fitorremediación, y los perjuicios de la contaminación por petróleo en nuestro país, considero muy importante investigar si cuatro especies vegetales nativas de la provincia de Napo pueden cumplir con las condiciones para aplicar esta técnica como una solución a la problemática explicada.

Al final del Proyecto, se espera haber determinado si las cuatro especies estudiadas tienen potencial de fitorremediación, con lo cual contribuiría al desarrollo de este tipo de aspectos biotecnológicos que necesita nuestro país.

1.2. Objetivos e Hipótesis

1.2.1. Objetivo General

Determinar los niveles de tolerancia a hidrocarburos de petróleo y potencial de fitorremediación en cuatro especies vegetales nativas andinas procedentes del sector Baeza-El Chaco, Ecuador.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Seleccionar cuatro especies vegetales de la región andino-amazónica, en el sector Baeza-El Chaco, que muestren potencial tolerancia a derrames de petróleo (debido a su presencia persistente en zonas de derrames reportados), que pudieran tener actividad fitorremediadora frente a hidrocarburos.
- Comprobar la tolerancia de estas cuatro especies en condiciones simuladas de derrames a dos concentraciones de petróleo en el suelo (conc. baja: 3%; conc. media: 6%).

- Verificar la ocurrencia y la intensidad de la actividad y potencial fitorremediador de cada especie, mediante análisis de concentración de hidrocarburos presentes en el sustrato cuatro a cinco meses después del inicio del experimento.
- Determinar, mediante análisis estadísticos univariados y multivariados, cuál de las plantas estudiadas puede ser la más eficaz en cuanto a su actividad fitorremediadora.

1.2.3. *Hipótesis*

Cuatro especies vegetales nativas procedentes del sector Baeza-El Chaco, Ecuador, tienen niveles de tolerancia a la presencia de hidrocarburos en el medio y muestran potencial de fitorremediación.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1. EL PETRÓLEO

Douglas (1998) define al petróleo como: *un líquido aceitoso, inflamable, con amplia variación en su viscosidad y olor fuerte característico, cuyo color varía de amarillo a castaño rojizo oscuro o negro, pero que normalmente exhibe una fluorescencia verdosa distintiva.*

Es de origen orgánico, formado a partir de residuos animales y vegetales sometidos a condiciones de temperatura y presión, sumado a una acción bacteriana anaeróbica (Lluch, 2008). Este proceso se efectuó hace millones de años, generando un combustible fósil catalogado en la actualidad como recurso no renovable (Dubois, 2005).

Por otra parte, Torres y Zuluaga (2009), enuncian algunas características interesantes del petróleo:

“Dentro de sus hidrocarburos constituyentes, la presencia proporcional mayor es la de los alcanos de cadena lineal, alcanos ramificados en menor cantidad, cicloalcanos y cantidades variables de hidrocarburos aromáticos (Fernández *et al.* 1992). Y la composición elemental de un crudo está condicionada por la predominancia de los compuestos tipo hidrocarburo: 84 a 87% de carbono (C), 11 a 14% de hidrógeno (H), de 0 a 8% de azufre (S), y de 0 a 4% de oxígeno (O) y nitrógeno (N) y metales como níquel y vanadio (Clark y Brown 1977; Howe-Grant, 1996)”.

2.1.1. Composición del Crudo de Petróleo

En el presente trabajo se utilizó petróleo crudo, aquel recién extraído de un yacimiento (Dubois, 2005), compuesto de una mezcla de gran variedad de hidrocarburos², que forman una solución cuya composición varía según las diferentes zonas y países. Además, el petróleo crudo contiene pequeñas cantidades de otros productos orgánicos como sulfuros, compuestos nitrogenados, oxigenados y metales.

² Desde los más sencillos con un solo átomo de carbono a los más complejos con elevado número de átomos de carbono.

Según Wauquier *et al.* (2004), se puede clasificar a los crudos en “pesados y ligeros”; es decir, de acuerdo a su densidad (la cual depende de una relación atómica H/C, siendo menor la densidad cuanto mayor es esta relación). Y los términos *parafrínico*, *aromático* y *asfáltico* (o *nafténico*) se utilizan para nombrar los tipos predominantes de constituyentes químicos encontrados en petróleos crudos de diversas localidades (Douglas, 1998).

Wauquier *et al.* (2004) menciona que la composición de los crudos se encuentra dada por los *constituyentes puros* y los *compuestos indefinidos químicamente*. Dentro de los *constituyentes puros* están los hidrocarburos mismos que forman parte de la familia predominante de compuestos (50 a 98% de la composición), por su abundancia y persistencia constituyen uno de los grupos de contaminantes más importantes en distintos compartimentos ambientales (Casellas *et al.* 1995, citado en Torres y Zuluaga, 2009). A la vez los hidrocarburos se dividen en varias familias químicas según su estructura basadas en la tetravalencia del carbono (según Wauquier *et al.* 2004):

- *H. alifáticos saturados o alcanos o parafinas*, C_nH_{2n+2} , tienen una cadena de átomos de carbono unidos cada uno con 0 a 3 átomos de hidrógeno.
- *H. cíclicos saturados, cicloalcanos o naftanos*, C_nH_{2n} , con una ciclación total o parcial del esqueleto carbonado. El número de átomos de carbono del anillo formado puede ser variable, aunque los más comunes son los de cinco o seis átomos. Los átomos de hidrógeno pueden ser sustituidos por una cadena parafrínica recta o ramificada llamada alquilo. Puede haber más de 2 anillos condensados en una estructura.
- *H. aromáticos*, C_nH_{2n-6} , son hidrocarburos cíclicos poliinsaturados, presentes en una gran proporción en los crudos de petróleo. En su fórmula pueden estar uno o más ciclos con tres dobles enlaces conjugados, confiriéndoles notables propiedades, los hidrocarburos aromáticos con menor cantidad de anillos suelen ser materias primas para la petroquímica, pero los homólogos superiores son nefastos para el ambiente y la sanidad pública. Los átomos de hidrógeno pueden estar sustituidos por radicales alquilo o por otros aromáticos.
- *H. alifáticos insaturados, oleofinas o alquenos*, C_nH_{2n} , tienen uno o varios dobles enlaces carbono-carbono, dando lugar a casos muy complejos en la formación de

isómeros. Los primeros componentes de esta familia también son materias básicas de gran importancia en petroquímica.

Otros compuestos puros son:

- *Compuestos heteroatómicos*, contienen: *a.* Compuestos de azufre abundantes en crudos (0,1 y más del 8%), influyen en la calidad del crudo; *b.* Compuestos oxigenados responsables de la acidez de los crudos (fenoles, furanos, ésteres, etc.), en menor cantidad que azufre; y, *c.* Compuestos nitrogenados: en los crudos se encuentran en las fracciones de punto de ebullición superior a 250°C, principalmente en resinas y asfaltenos, como amidas, aminas, piridinas, etc.
- *Compuestos organometálicos*, presentes en las fracciones más pesadas con resinas y asfaltenos; pueden encontrarse asociados a átomos metálicos como del Níquel y Vanadio, en cuyo caso forman parte de la familia de las porfirinas (conjunto de cuatro anillos pirrólicos).

Según los mismos autores (Wauquier *et al.* 2004), dentro de los compuestos *indefinidos químicamente* están:

- Asfaltenos, constituidos por acumulación de láminas poliaromáticas condensadas, unidas por cadenas saturadas. Son sólidos, brillantes con peso molecular de 1000 a 100000. Son los responsables de taponar tuberías, por sus elevados valores de densidad y viscosidad en los crudos pesados.
- Resinas, son moléculas con un fuerte carácter aromático, que contienen heteroátomos, tienen una masa molecular entre 500 y 1000.

2.1.2. *Reseña histórica de la Extracción de Petróleo en el Ecuador*

Guaranda (2011) coordinador jurídico del INREDH (Fundación Regional de Asesoría en Derechos Humanos), resume en su boletín de forma muy interesante la historia del petróleo en Ecuador: El primer pozo petrolero fue perforado en la región Costa en 1911 (Península de Santa Elena), y desde 1922 varias empresas internacionales han explorado, explotado, comercializado y refinado crudo en Ecuador. En 1967, Texaco perforó el primer pozo comercial en la Amazonía; en los años siguientes, las mayores obras de infraestructura fueron el Sistema de Oleoducto Trans Ecuatoriano SOTE y la Vía a Coca. Hasta 1990 Texaco extrajo el 88% del total de la producción nacional de

petróleo y operó el oleoducto; perforó 399 pozos y construyó 22 estaciones de perforación. En 1971, el gobierno ecuatoriano decidió entrar a la Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP) y en junio de 1972 se creó la Corporación Estatal Petrolera Ecuatoriana (CEPE); se puso en vigencia la Ley de Hidrocarburos y se incrementaron las regalías para el estado; se estableció que los contratos petroleros podían durar máximo 20 años y su extensión se fijó en 200 000 has, con lo cual las compañías devolvieron el 80% de sus concesiones que les fueron otorgadas originalmente por 50 años. En 1989, se creó PETROECUADOR en reemplazo de CEPE y se conformó un Holding, es decir, una Matriz y seis Filiales: tres permanentes y tres temporales. A partir de 1982, la política petrolera ha sido volcada hacia la apertura a las transnacionales. Y en 1993 por decisión del Gobierno, el Ecuador se retiró de la OPEP, reintegrándose en el periodo 2007-2008.

Desde 1985 hasta 1996 se ocupó un área de aproximadamente 4.2 millones de hectáreas, de las cuales casi 3.6 millones corresponden a los 13 millones de hectáreas que conforman la Amazonía ecuatoriana. En el 2002 se termina de construir el Oleoducto de Crudos Pesados (OCP) como parte de la estrategia de expansión de la frontera petrolera (Guaranda, 2011).

Por otro lado, Vogliano (2009) menciona que en el 2006 el gobierno ecuatoriano declaró la caducidad del contrato firmado con la empresa Occidental por haber cometido graves violaciones al contrato, a las leyes y a los derechos de la población durante sus operaciones en el Bloque 15; el Gobierno además propició la reforma a la Ley de Hidrocarburos para conseguir para el Estado un mayor porcentaje en la distribución de las ganancias, ya que las transnacionales se llevaban el 80% de las mismas y para el Estado quedaba el 20% en el mejor de los casos.

En el 2007 el Gobierno anuncia la construcción de una nueva refinería en la provincia de Manabí y también se inicia el intercambio de crudo por derivados con Venezuela (Guaranda, 2011).

En 2008, el gobierno ecuatoriano, lanza la iniciativa ITT (Ishpingo Tambococha Tiputini) para dejar el crudo bajo tierra, a cambio de una compensación internacional por la conservación de la biodiversidad del bloque ITT y su importancia como pulmón

de la Tierra. Sin embargo, la política de expansión petrolera aún sigue en pie (Vogliano, 2009).

2.1.3. Producción y Potencial petrolífero

El petróleo es la principal fuente económica del Ecuador y su producto de mayor exportación (Jones, 2010); con una producción promedio de 475173 barriles de crudo por día, de los cuales un 34 por ciento es extraído por las empresas privadas, mientras que el 66 restante es generado por las empresas públicas Petroecuador, Petroamazonas y Río Napo en asociación con PDVSA (Silva, 2010). Considerando según el Ministerio de Recursos no Renovables la existencia de 3362 pozos petroleros (ANDES/GC, 2010).

2.1.4. Derrames de Petróleo en Ecuador

Desde 1994 a junio de 2002 se produjeron 779 derrames de petróleo a un promedio de casi 92 anuales u ocho mensuales (Vogliano, 2009). Guaranda (2011) en su boletín “Acciones Judiciales por Derrames de Petróleo” manifiesta que en 2003 hubo 138 derrames (2.8 semanales, en promedio), en 2004 ascendió a 178 (3.7 semanales), en el 2005, bajó a 169 (3.5 por semana) y en año 2008 hasta el mes de septiembre, según datos de Petroecuador, se registraron 117 derrames de petróleo, lo que revela que un incidente de este tipo se produjo cada dos días, en promedio. Estas cifras son alarmantes, pues las consecuencias para el ambiente son nefastas, con pérdidas incalculables.

Las dos principales causas de los derrames de petróleo en Ecuador son: la rotura de los oleoductos debido a la antigüedad de las tuberías y su mal mantenimiento, y los atentados provocados; siendo este último, el pretexto perfecto que las compañías petroleras han encontrado para evadir responsabilidades civiles y ambientales, llegando a determinar que en 2005 los atentados fueron la principal amenaza para las tuberías que transportan crudo (Guaranda, 2011).

Guaranda (2011) menciona, que al evaluar los beneficios obtenidos frente a los desastres producidos en la industria petrolera, la balanza se inclina abismalmente a lo

negativo; encontrando una sociedad con un 75 y 80% de pobreza, cuando la riqueza que se ha generado ha ido a los bolsillos de unos pocos y no ha sido una fuente de utilidad para todos los ecuatorianos.

2.1.5. *Contaminación y consecuencias de los derrames de Petróleo en Ecuador*

Según la Ley 10/1998 sobre Residuos Tóxicos de la legislación española (López, 2003) los hidrocarburos se encuentran dentro los veintinueve grupos de productos tóxicos que representan un elevado nivel de riesgo para la vida, su fuente de procedencia es principalmente la industrial. En el caso de Ecuador una fuente importante son los derrames de petróleo o de sus derivados; los efectos tóxicos que pueden provocar este grupo de productos son cáncer y daños al sistema nervioso humano (Eweis *et al.* 1999; citado en López, 2003).

Un claro ejemplo de estos efectos se presenta en un estudio realizado por un equipo médico del Departamento de la Pastoral Social del Vicariato de Aguarico, con la colaboración de la Facultad de Higiene y Medicina Tropical de la Universidad de Londres (Kintto, 1999), donde se detectó una importante incidencia de cáncer en la Joya de los Sachas (tres veces superior al de otras regiones del país), una zona de la provincia amazónica de Orellana; el estudio atribuye el peligro a los veinte años de elevada contaminación con tóxicos por causa de la explotación petrolera que ha sufrido esta región; pues la mayoría de los ríos y riachuelos, habitualmente utilizados por los moradores de este sector para consumo de agua están contaminados con petróleo en una proporción 200 y 300 veces mayor al límite permitido para el agua de consumo humano (Kintto, 1999).

Por otro lado, Vogliano (2009) explica que la contaminación de suelos producida por los derrames y por los desechos de la industria repercute en la baja productividad de la tierra, causando pérdidas económicas a la población por la muerte de ganado y pérdida de cultivos, generando condiciones de mayor pobreza que en otras poblaciones que no tienen contacto con esta industria; igualmente manifiesta la existencia de una mayor cantidad de enfermedades en la población como malformaciones en los nacimientos, abortos, infecciones de piel, infecciones respiratorias, anemia, desnutrición, etc.

La explotación petrolera también ha acarreado graves perjuicios ecológicos, pues todas sus fases afectan al bosque húmedo tropical en la Amazonía caracterizado por poseer una altísima biodiversidad; se han generado millones de galones de desechos tóxicos descargados en el ambiente, contaminando suelos, esteros y ríos; en los últimos años, Petroecuador y empresas petroleras privadas están ya diseñando planes estratégicos de cuidado al ambiente y ejecutando obras de beneficio de la comunidad (Medina, 2011).

Benavides *et al.* (2006), detalla (citando a otros autores) algunos de los efectos que provocan los hidrocarburos de petróleo en el ambiente:

- En el *agua*, los hidrocarburos vertidos flotan impidiendo la entrada de luz y el intercambio gaseoso, dando comienzo a la solubilización de compuestos hidrosolubles y a la afección de diferentes poblaciones (Fatima *et al.* 2003).
- En el *suelo* se ha observado inhibición en la germinación y un marcado retraso en el crecimiento de las plantas evaluadas. Asimismo, los hidrocarburos poliaromáticos (PHA) en ecosistemas forestales y plantas madereras, han demostrado un efecto de necrosis foliar (Schmidt, 2000).
- Los tipos de suelos mayormente afectados son de zonas bajas con altos contenidos de materia orgánica y arcilla.

2.2. FITORREMEDIACIÓN

2.2.1. Definición

El término genérico “fitorremediación” está constituido por un prefijo griego *phyto*, que significa planta, y un sufijo latino *remedium*, que significa eliminar algo pernicioso (López, 2003).

La fitorremediación constituye una variación de las técnicas de biorremediación (López, 2003); por tanto, es una técnica biológica de remediación de suelos contaminados (Eweis, 1999, citado en López *et al.* 2005), cuyo objetivo según Harvey *et al.* (2002) es degradar, asimilar, metabolizar o detoxificar metales pesados, compuestos orgánicos y compuestos radioactivos por medio de la acción combinada

de plantas y microorganismos con capacidad fisiológica y bioquímica para absorber, retener, degradar o transformar sustancias contaminantes a formas menos tóxicas.

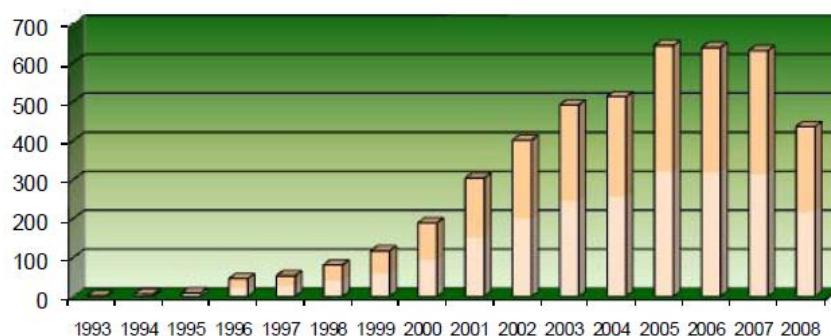
Por otro lado, Ortiz (2004) menciona los casos en los que se utiliza esta técnica como: en sitios contaminados con metales, plaguicidas, solventes, explosivos, petróleo, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y lixiviados en vertederos. En el caso de efluentes, las principales áreas de aplicación de la fitorremediación son el tratamiento de aguas servidas y la neutralización del drenaje ácido de la minería. Y, según Mentaberry (2011), para zonas contaminadas con solventes orgánicos, herbicidas, hidrocarburos derivados del petróleo, bifenilos policlorinados (PCBs) y tricloroetileno (TCE).

2.2.2. Inicio y Desarrollo de la Fitorremediación

La USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1996,1997, citado por López *et al.* 2005) menciona que las técnicas biológicas se desarrollaron hace dos décadas (para 2011, habrán pasado 3 décadas) a escala piloto, pero en los últimos años se realizan a escala comercial, y aunque según ArgenBio (2007) la técnica de Fitorremediación se encuentra en desarrollo, otros autores como Frick *et al.* (1999, citados en Sierra, 2006) indican que esta técnica ha adquirido auge por ser un procedimiento pasivo, estéticamente agradable, útil para remediar simultáneamente una gran variedad de contaminantes.

En la Figura 1, se puede observar como la Fitorremediación ha experimentado un crecimiento acelerado durante la última década. Aunque los primeros reportes de publicaciones sobre fitorremediación datan de 1993, el periodo importante de innovación empezó en 1996 (Saad *et al.* 2009):

Figura 1. Publicaciones por fitorremediación por año.



Fuente: Saad *et al.* 2009. “Fitorremediación: estudio de inteligencia tecnológica competitiva”.

“La fitorremediación es aún una tecnología muy joven, pues se ha explorado la capacidad catalítica sólo de unas cuantas especies. Las especies reportadas con las mayores capacidades bioquímicas pertenecen a grupos botánicos distantes. Con la notable excepción de los helechos (Chao-Yang y Tong-Bin, 2006) y las especies de la familia *Brassicaceae* (en el caso de los metales pesados), no hay grupos taxonómicos especialmente prometedores. Hay plantas que se han estudiado mucho, pero esto se debe más a que pueden cultivarse fácilmente, que a sus capacidades sobresalientes. En la enorme diversidad vegetal hay todavía muchas capacidades por descubrir”.

2.2.3. Perspectivas de desarrollo para el futuro de la fitorremediación

La aplicación de la fitorremediación es cada vez mayor y sus resultados se están valorando como muy positivos, lo cual permite visualizar que la fitorremediación empieza a ser una tecnología competitiva en la recuperación de suelos y aguas contaminados (López, 2003).

Si bien es cierto, en contraste a la fitorremediación existen limitantes tales como condiciones que impiden un crecimiento normal de las plantas, concentraciones de contaminantes que exceden del nivel de tolerancia de éstas, el tiempo para la descontaminación (la fitorremediación es lenta), etc. (López, 2003). Además, para que se extiendan todas las capacidades de degradación o acumulación de contaminantes de las plantas que vayan a ser utilizadas como individuos fitorremediadores, es necesario que sean sometidas a un proceso sistemático de selección (Saad *et al.* 2009). Todas estas limitantes sumadas a que el proceso de domesticación y mejoramiento de una planta silvestre por métodos convencionales puede llevar décadas, de alguna manera retrasan el desarrollo de la técnica de fitorremediación.

Sin embargo, la aplicación de la biotecnología vegetal puede acelerar mucho el proceso. Por ejemplo, se puede hacer selección de individuos sobreproductores de enzimas activas por técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Además, los estudios genómicos y proteómicos son una herramienta poderosa para comprender las bases moleculares de los sistemas de biorremediación. Una vez identificados los elementos genéticos de los sistemas pueden utilizarse para realizar selección asistida por marcadores moleculares o para conseguir plantas élite por el empleo de ingeniería genética (Eapen y D'Souza, 2005, citados en Saad *et al.* 2009).

En cualquier instancia, las nuevas fronteras de la fitorremediación demuestran la necesidad de abordar esta técnica desde la multidisciplinaridad. Es necesario incluir expertos en botánica, bioquímica, ecología, fisiología vegetal, genética, microbiología, edafología, geoquímica y expertos relacionados con las consecuencias de la contaminación para la salud de los ecosistemas y sus habitantes (López, 2003).

2.2.4. Ventajas de la Fitorremediación

- En comparación con las tecnologías de remediación tradicionales, la fitorremediación incluye la posibilidad de generar menos residuos secundarios, menos perturbación al ambiente y la capacidad de dejar los suelos en el mismo lugar y en condiciones de uso después del tratamiento (Miller, 1996).
- La fitorremediación frente a otras técnicas biotecnológicas por medio de las plantas tiene la capacidad de transformar y mineralizar una amplia variedad de complejos orgánicos (Saad *et al.* 2009).
- Mentaberry (2011), en su documento “Fitorremediación y Agrobiotecnología”, manifiesta que las plantas pueden ser utilizadas como bombas extractoras de bajo costo para depurar suelos y aguas contaminadas (costo 7-10 veces menor respecto de los métodos tradicionales), en el Cuadro 1 se puede observar una comparación económica con respecto a otras técnicas de remediación.

Además, Mentaberry (2011) menciona como ventajas que: las plantas emplean energía solar, el tratamiento es *in situ*, algunos procesos degradativos ocurren en forma más rápida con plantas que con microorganismos, es un método apropiado para descontaminar superficies grandes o para finalizar la descontaminación de

áreas restringidas en plazos largos, es una metodología con buena aceptación pública.

Cuadro 1. La fitorremediación es económicamente competitiva respecto de otras alternativas de remediación.

Contaminante	Costo de Fitorremediación	Costo estimado usando otras tecnologías
Metales	U\$ 87.5 por m	U\$ 250 por m
Petróleo	U\$ 70000 por sitio	U\$ 850.000
4 Ha de tierra contaminada con plomo	U\$ 500.000	U\$ 12 millones
Radionucleótidos en agua superficial (4.000 litros)	U\$ 2 a U\$ 6	No determinado
1 hectárea a 15 cm de profundidad (varios contaminantes)	U\$ 2500 a U\$ 15000	No determinado

Fuente: Adaptado de Chappell, US Environmental Protection Agency. 1998 (citado en Mentaberry, 2011).

- En fitorremediación, las plantas denominadas hiperacumuladoras, pueden movilizar los contaminantes hacia sus tallos y hojas, los que posteriormente son cortados, quemados o vendidos para otros usos dependiendo de las plantas utilizadas en esta técnica, siendo ésta una forma más barata que los métodos tradicionales de remediación. Estimando que un sitio con 5000 toneladas de suelo contaminado producirá sólo 20-30 toneladas de cenizas. Además, que al incinerar la biomasa al final del proceso de fitorremediación los contaminantes acumulados en tales plantas no se transmiten a través de las redes alimentarias a otros organismos (Ortiz, 2004).

2.2.5. Desventajas de la Fitorremediación

Las principales barreras de entrada de esta tecnología según Saad *et al.* (2009) son:

- La identificación de especies prometedoras,
- El establecimiento de procesos eficientes de cultivo para las especies vegetales seleccionadas y

- Un proceso de mejoramiento genético, que potencie las capacidades naturales de las especies seleccionadas y llegue al desarrollo de poblaciones homogéneas y estables con un alto contenido de enzimas activas.

Mientras que las limitaciones o desventajas de la fitorremediación son:

- Largos períodos de tiempo necesario para el proceso (generalmente varias temporadas de crecimiento) (López, 2008).
- El proceso se limita a la profundidad de penetración de las raíces en tierra o en aguas poco profundas (Mentaberry, 2011).
- La posibilidad la entrada de los contaminantes en la cadena alimentaria a través del consumo que los animales hacen del material vegetal (López, 2008).
- La biodisponibilidad de los compuestos o metales es un factor limitante de la captación (Mentaberry, 2011).
- La fitotoxicidad es un limitante en áreas fuertemente contaminadas (López, 2008), por lo que en el caso de algunas especies vegetales se utilizan para eliminar restos de contaminantes atrapados en el suelo que quedan de la aplicación con las técnicas mecánicas de tratamiento (Miller, 1996).
- Deben considerarse contaminaciones potenciales de la cadena alimentaria y napas de agua (Mentaberry, 2011).

Cunningham *et al.* (1997, citados por López, 2008) recomiendan que para superar estas limitaciones es necesario comprender tres puntos claves de la fitorremediación:

- los mecanismos de la fitorremediación,
- las fases que participan en la fitorremediación y
- las interacciones planta-microorganismos.

2.2.6. Clasificación general de la Fitorremediación

La fitorremediación se clasifica en dos grandes grupos: 1) La biorremediación de sustancias orgánicas recalcitrantes³ o peligrosas, de los cuales los más estudiados son los contaminantes derivados del petróleo (hidrocarburos poliaromáticos) y los explosivos peligrosos como el TNT; siendo el principal objetivo es degradar los

³ *Sustancias orgánicas recalcitrantes*: son aquellas sustancias que contienen en su estructura simultáneamente átomos de hidrógeno y carbono, son de lenta degradación, es decir de mayor persistencia en la biosfera sin alterarse y de alta toxicidad.

contaminantes hasta obtener un producto menos tóxico, 2) La otra gran área de investigación es la remoción de sustancias tóxicas elementales, grupo en el que están comprendidos los metales pesados y los elementos radioactivos (Weis *et al.* 2006, citados en Saad *et al.* 2009).

Debido a que el tema central de esta investigación es sobre hidrocarburos de petróleo, se limitará en el mismo a la fitorremediación de contaminantes orgánicos.

2.2.7. Características principales de la Fitorremediación

Miliarium (2004) resume de manera muy comprensible las principales características del proceso:

- La fitorremediación es una técnica de limpieza pasiva, estéticamente agradable y dependiente de la energía solar.
- Se emplea en zonas no muy extensas y donde la contaminación no está a mucha profundidad.
- Es una técnica empleada para un amplio rango de contaminantes.

Además según otros autores:

- La descontaminación depende de la profundidad de las raíces de la especie usada (Ortiz, 2004).
- Existen plantas que tienen la capacidad de hiperacumular intrínsecamente en ellas, pero también pueden obtenerse plantas con estas capacidades por medio de técnicas de Ingeniería Genética (ArgenBio, 2007).
- Tanto en artículos como en patentes, el área más intensamente estudiada dentro de la fitorremediación es la de metales pesados (Saad *et al.* 2009).
- Depende de la tolerancia de las plantas a los contaminantes (López, 2003).

2.2.8. Mecanismos de la Fitorremediación

Ortiz (2004) menciona que una vez que los contaminantes se encuentran en contacto con las plantas, éstos pueden entrar a diversas rutas, dependiendo de la naturaleza del contaminante y de la especie vegetal, es así que estas rutas o mecanismos como lo manifiesta López *et al.* (2005) llevan a una detoxificación de contaminantes a través de al menos uno de los siguientes mecanismos (Figura 2):

- **Fitoextracción:** también conocida como fitoacumulación, en este mecanismo se usan las plantas para absorber y concentrar contaminantes en las partes cosechables o aéreas (hojas, tallos y raíces) (ArgenBio, 2007). López (2005), señala que éste mecanismo ha sido ampliamente estudiado en plantas que acumulan metales (Jian *et al.* 1997) y, más recientemente, con materiales radioactivos (Dushenkov, 2003). El proceso puede remediar metales como: cadmio, cobalto, cromo, níquel, mercurio, plomo, selenio, zinc (ArgenBio, 2007), y otros tóxicos inorgánicos (Arsénico, etc.) (Mentaberry, 2011); además, se ha utilizado para eliminar hidrocarburos de agua y suelo con cultivos de alfalfa (*Medicago sativa*), álamos (*Populus*), enebro (*Juniperus communis*) (Vázquez, 2003, citado por Ortega *et al.* 2009).

Las plantas preferentemente utilizadas para la aplicación de éste tipo de técnicas son las plantas hiperacumuladoras, éstas presentan acumulación extrema de metales (mediante absorción selectiva) en sus tejidos aéreos. La gran mayoría de las especies hiperacumuladoras conocidas pertenecen a comunidades vegetales características de suelos ricos en metales (u otro contaminante), donde están perfectamente adaptadas a las condiciones ambientales particulares de su hábitat (Brooks, 1998; Reeves, 1992; citados por Diez, s.f..)

- **Rizofiltración:** Se basa en la absorción o precipitación, a través de las raíces de plantas, de contaminantes que están en una solución alrededor de la zona de raíces. Es similar a fitoextracción pero a diferencia de ésta, la rizofiltración se utiliza para tratar medios líquidos y no edáficos (López *et al.* 2005). Técnica relativamente cara de implementar (Mentaberry, 2011), este último autor cita que es útil para cantidades pequeñas de aguas residuales conteniendo compuestos inorgánicos peligrosos (radionucleótidos); la recreación de los humedales artificiales se utilizan para una amplia gama de contaminantes inorgánicos (metales, percloratos, cianuro, nitratos y fosfatos) y contaminantes orgánicos (explosivos y herbicidas); además ArgenBio (2007) propone su aplicación para cadmio, cobalto, cromo, níquel, mercurio, plomo, selenio, zinc isótopos radioactivos y compuestos fenólicos. Por ejemplo, lenteja de agua (*Lemna minor*), lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) se utilizan en tratamientos para la remoción de metales pesados de aguas contaminadas (Núñez *et al.* 2004.).

- **Fitoestimulación o rizodegradación:** Las plantas generan exudados radiculares que estimulan el crecimiento de microorganismos nativos de la rizósfera capaces de degradar compuestos orgánicos xenobióticos (López *et al.* 2005),

Remedia: Hidrocarburos derivados del petróleo y poliaromáticos, benceno, tolueno, atrazina, etc. (ArgenBio, 2007).

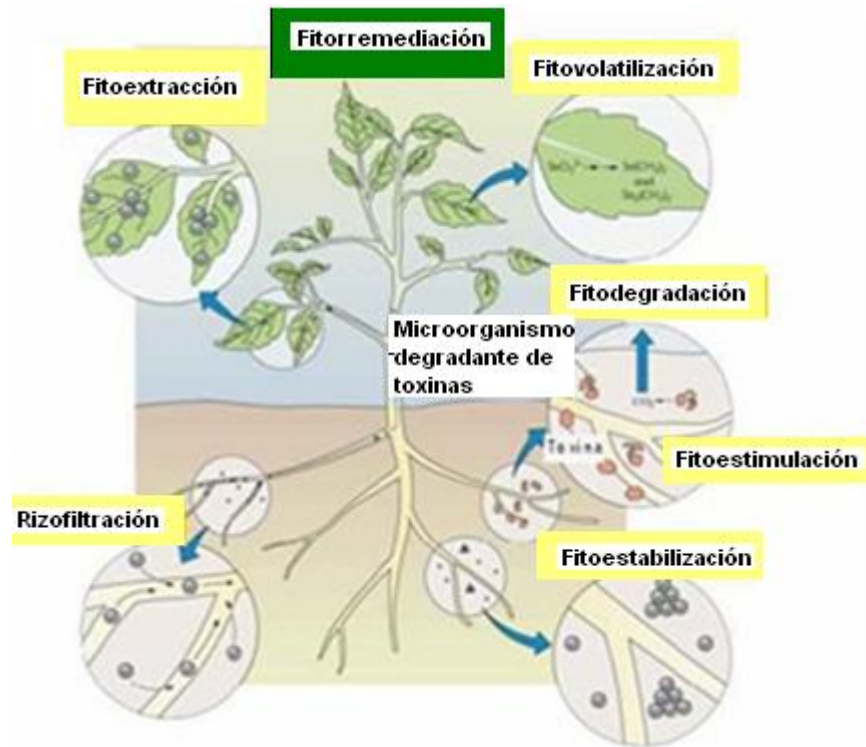
Por ejemplo, Festuca alta (*Festuca arundinacea*) tiene capacidad de rizodegradación de hidrocarburos de petróleo con una tasa máxima de degradación de 38 mg de hidrocarburos/kg mes (Siciliano *et al.* 2003, López, 2008).

- **Fitoestabilización:** mecanismo que estabiliza compuestos xenobióticos. Permite reducir la biodisponibilidad y la movilidad de los contaminantes evitando el transporte a capas subterráneas (capas de agua) o a la atmósfera (López *et al.* 2005), mediante la adsorción en la superficie de la raíz o mediante la precipitación en la zona de la rizósfera (ArgenBio, 2007). Se utiliza en los suelos donde la gran cantidad de contaminantes imposibilita la fitoextracción, y se basa en el uso de plantas tolerantes a los contaminantes (Ortega *et al.* 2009).

Remedia: Lagunas de desecho de yacimientos mineros, fenólicos y compuestos clorados (ArgenBio, 2007). Además, Mentaberry (2011) menciona que es usado para remediar contaminantes orgánicos hidrofóbicos que no pueden ser incorporados por la planta pero que pueden ser degradados por microorganismos (PCBs, PAHs e hidrocarburos derivados del petróleo).

Entre las plantas que realizan este mecanismo están: *Raphanus* sp. absorbe compuestos fenólicos (Dec y Bollag, 1994; citados por López, 2008); Diez, (s.f.), menciona que las plantas frecuentemente utilizadas para este proceso son herbáceas metal-tolerantes de rápido crecimiento como las de la familia Poaceae, del género *Lolium*, *Festuca* y *Agrotis* sp; ejemplos específicos de la efectividad de la fitoestabilización son Chépica (*Agrostis capillaris*), el cual muestra un descenso significativo de la solubilidad del cobre (Romkens *et al.* 1999) y las plántulas de pino que reducen la solubilidad del plomo en un 93% (Turpeinen *et al.* 2000).

Figura 2. Mecanismos de la fitorremediación (se indica la zona de la planta en donde ocurre el proceso).



Fuente: ArgenBio. 2007. “Biorremediación: organismos que limpian el ambiente”, *El Cuaderno de Por qué Biotecnología* No. 36.

- **Fitovolatilización:** proceso en el que las plantas captan y modifican metales pesados o compuestos orgánicos a especies volátiles y los liberan a la atmósfera con la transpiración (ArgenBio, 2007).

Remedia: Mercurio, selenio y solventes clorados (tetraclorometano y triclorometano) (ArgenBio, 2007). Puede utilizarse también para compuestos orgánicos con formas volátiles (TCE y MTBE) (Mentaberry, 2011).

Las raíces de Álamo (*Populus deltoides*) fueron expuestas a una solución de tricloroetileno (70 mg/L) durante 26 días, observándose que el 90% del tricloroetileno fue volatilizado a través de las hojas (Orchard *et al.* 2000; citados por López, 2008).

- **Fitodegradación:** Las plantas acuáticas y terrestres captan, almacenan y degradan compuestos orgánicos para dar subproductos menos tóxicos o no tóxicos. Esto ocurre mediante la liberación de enzimas y otros metabolitos que subsecuentemente descomponen a los contaminantes (ArgenBio, 2007). En determinadas ocasiones, los productos de la degradación le sirven a la planta para acelerar su crecimiento; en otros casos los contaminantes son solo biotransformados (López *et al.* 2005).

Remedia: Municiones (DNT, RDX, nitrobenzeno, nitrotolueno), atrazina, solventes clorados, DDT, pesticidas fosfatados, fenoles y nitrilos, etc. (ArgenBio, 2007). Y Mentaberry (2011) indica que es útil para compuestos orgánicos que se movilizan dentro de la planta, (herbicidas, TNT, MTBE y TCE).

Por ejemplo, el álamo (*Populus deltoides*) transforma tanto metil terbutil éter (MTBE) como tricloro etileno en acuíferos, que es una molécula mas sencilla (Marjories *et al.* 2001, Newman *et al.* 1999, y Kassel *et al.* 2002; citados por López, 2008).

Según López *et al.* (2005) esta serie de biotransformaciones ocurre usualmente en la naturaleza, denominándose atenuación natural; es así, que se ha observado que los niveles de contaminantes se reducen más rápidamente en suelos con plantas que en suelos sin plantas.

2.2.9. Interacciones planta-microorganismos

Según López (2008) la microfauna y la mesofauna (protozoos, nemátodos, insectos y ácaros) presentes en la comunidad de la rizósfera, contribuyen significativamente en los procesos de descomposición con el catabolismo de sustancias nocivas en la rizósfera. La rizósfera provee un microambiente complejo y dinámico, donde las bacterias y hongos (microbiota), en asociación con las raíces, forman comunidades únicas que responden a los exudados radiculares; los microorganismos pueden causar un beneficio o una enfermedad a la planta y tienen un considerable potencial para la detoxificación.

2.2.10. Fases de Fitorremediación en una Planta Fitorremediadora

Las plantas fitorremediadoras pueden realizar cualquiera de los mecanismos de fitorremediación mencionados en el ítem anterior siguiendo tres fases: absorción, excreción y desintoxicación de contaminantes (López, 2008).

- La **absorción** de contaminantes se realiza a través de las raíces y las hojas mediante los estomas y la cutícula de la epidermis. Esto ocurre en la rizodermis de las raíces jóvenes, que absorben los compuestos por ósmosis dependiendo de factores extremos como la temperatura y el pH del suelo. Otros factores importantes que inciden en la

penetración del contaminante son su peso molecular e hidrofobicidad que determinan que estas moléculas atraviesen las membranas celulares de la planta. Después de cruzar la membrana, los contaminantes son distribuidos a través de toda la planta (Harvey *et al.* 2002).

- Los contaminantes absorbidos por las raíces, se **excretan** vía hojas (fitovolatilización). Cuando las concentraciones de los contaminantes son elevadas, solo pequeñas fracciones (menos del 5%) se excretan sin cambios en su estructura química (Kvesitadze *et al.* 2001, citados por López, 2008).
- La **desintoxicación** de los compuestos orgánicos se lleva a cabo por la vía de la mineralización hasta dióxido de carbono.

2.2.11. Plantas más utilizadas en Fitorremediación

La mayor parte de las plantas fitorremediadoras (hiperacumuladoras) están constituidas por pequeñas plantas herbáceas que se desarrollan en zonas metalúrgicas naturales o en depósitos mineros antiguos (Baker, 1998, citado en López, 2003).

Ortiz (2004) manifiesta que algunas plantas que se usan en fitorremediación son alfalfa, plantas de cañas, brasicáceas, euforbiáceas, asteráceas y tomate común; actualmente se conocen plantas acumuladoras de plomo, cadmio, cromo, níquel, cobalto, cobre, zinc y selenio.

La Revista Latinoamericana de Microbiología (2006, citada por Torres y Zuluaga, 2009) resume las plantas más utilizadas en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo: *Zea mays*, *Panicum maximun*, *Paspalum virgatum*, *Echinochloa polystachya*, *Sorghum vulgare*, *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus coccineus*, *Chamaecrista nictitans*, *Brachiaria brizantha*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, entre otras.

Actualmente, se conocen alrededor de 400 especies de plantas con capacidad para hiperacumular selectivamente alguna sustancia; en la mayoría de los casos, no se trata de especies raras, sino de cultivos conocidos; un ejemplo de estas es el girasol

(*Helianthus annuus*) que es capaz de absorber en grandes cantidades el uranio depositado en el suelo (ArgenBio, 2007).

2.2.12. Fitorremediación de contaminantes orgánicos

En el caso de los contaminantes orgánicos, la meta de la fitorremediación es la mineralización de las sustancias hasta componentes no tóxicos (Saad *et al.* 2009).

López (2003) manifiesta que son dos los mecanismos por los que las plantas pueden incrementar su resistencia a los contaminantes orgánicos. El primero consiste en la transformación de los elementos tóxicos en la rizósfera; para ello la planta libera más del 20% de su fotosintato⁴ dentro del suelo en forma de exudado radicular. El fotosintato liberado está constituido por una mezcla de azúcares, alcoholes, fenoles, ácidos orgánicos y proteínas que rápidamente son utilizados por las comunidades microbianas existentes en la rizósfera. Estas poblaciones pueden ser, de 100 a 10000 veces mayores que las poblaciones presentes en la matriz del suelo, y se caracterizan por presentar enzimas específicas capaces de metabolizar los contaminantes orgánicos hacia formas orgánicas menos tóxicas.

El segundo mecanismo se produce una vez que los contaminantes han atravesado el sistema radicular. En este caso, los elementos tóxicos pueden seguir dos vías de transformación, por un lado se trasladan hacia brotes y hojas para, posteriormente, volatilizarse, y por otro pueden sufrir procesos de metabolización hacia nuevas formas. Estos nuevos compuestos pueden mineralizarse o pueden acumularse como nutrientes o como nuevos contaminantes.

Se han estudiado enzimas vegetales que pueden degradar anillos aromáticos, bifenilos policlorados, fenoles y tricloroetileno. Las enzimas de interés particular en fitorremediación son: dehalogenasas, peroxidasas, nitroreductasas, nitrilasas y fosfatasas; la utilización efectiva de estos sistemas, puede requerir en algunos casos, la sobre expresión de genes existentes (Saad *et al.* 2009).

⁴ Carbohidratos y otros compuestos que se producen en la fotosíntesis.

La eficiencia de la degradación depende también de la biodegradabilidad⁵ del contaminante, la cual a su vez depende de su estructura, concentración y las condiciones ambientales del sitio donde se encuentra. Además, de las enzimas ya mencionadas, existen elementos que son liberados por plantas y microorganismos para modificar la biodisponibilidad⁶ del contaminante, haciéndolo mas fácil de biodegradar hacia formas menos tóxicas (Mentaberry, 2011), éstos elementos se describen a continuación:

- *Biosurfactantes* (ramnolípidos): aumentan disponibilidad de compuestos hidrofóbicos.
- *Exudados vegetales*: pueden promover la síntesis de biosurfactantes.
- *Enzimas* (vegetales y bacterianas): modifican las cadenas laterales de algunos compuestos orgánicos aumentando su biodisponibilidad.
- *Secreción de H⁺* por parte las plantas que acidifican el suelo, creando un ambiente propicio para la degradación de los contaminantes.

Gianfreda y Rao (citados en Saad *et al.* 2009) clasifican a los contaminantes más comunes por su facilidad de biodegradabilidad en dos grupos:

- Las moléculas simples como hidrocarburos lineales de 1 a 15 carbonos, los alcoholes, fenoles, aminas, ácidos, esteres y amidas son fácilmente biodegradables.
- En cambio, los bifenilos policlorados, los hidrocarburos aromáticos policíclicos y los pesticidas son difíciles de biodegradar, estas sustancias recalcitrantes a la biodegradación que suelen acumularse en el ambiente son el objeto principal de la ingeniería de biorremediación.

En cuanto a la fitorremediación de Hidrocarburos, Ferrera *et al.* (1995, citados en Lumelli, 2002) exponen que se ha comprobado que el contacto con el petróleo daña y mata el follaje y algunos tejidos leñosos expuestos. No obstante, en otras especies, no todos los tejidos perennes se dañan hasta el punto de morir y, en varias ocasiones, la

⁵ *Biodegradabilidad*: es la parcial simplificación o la completa destrucción de la estructura molecular de los contaminantes medioambientales por reacciones bioquímicas complejas, genéticamente reguladas, catalizadas por microorganismos y plantas
(http://personal.us.es/evpolo/pdf/trab_dirig/pinedorevilla_trigochoorda.pdf).

⁶ *Biodisponibilidad*: designa el estado de la fracción de compuestos químicos que está disponible para la eliminación y/o transformación por organismos vivos
(http://personal.us.es/evpolo/pdf/trab_dirig/pinedorevilla_trigochoorda.pdf).

adición de nutrientes a suelos contaminados puede favorecer el establecimiento de plantas y aumentar las poblaciones rizosféricas.

Es muy importante además tener en cuenta que a medida que transcurre el tiempo después de un derrame se va modificando la composición del hidrocarburo por acción de los agentes ambientales. En primera instancia se pierden los volátiles y después se produce la eliminación de parafinas, ya sea por evaporación, por actividad fotoquímica o actividad biológica; luego se eliminan otros componentes. Como resultado de ello el contaminante se enriquece en compuestos pesados, más difíciles de degradar; por lo que la velocidad de reacción disminuye a medida que transcurre el tiempo (Buffle *et al.* 1987; citados en Guzmán *et al.* 2005).

2.2.13. Alternativas para la Obtención de Especies Útiles para Fitorremediación de Derrames de Hidrocarburos

Según Saad *et al.* (2009), existen dos alternativas para la obtención de especies útiles en fitorremediación:

1. Realizar una búsqueda sistemática para localizar plantas que reúnan los requisitos necesarios para fitorremediar suelos contaminados, es decir, plantas con altas capacidades de biotransformación y/o hiperacumuladoras de contaminantes orgánicos recalcitrantes (de lenta degradación); además, por razones económicas y prácticas, una especie adecuada tiene que contar con una serie de requisitos adicionales: crecimiento rápido, alta biomasa, raíces profundas, ser un vegetal poco apetecible para los herbívoros, retener grandes concentraciones de metal en las partes aéreas de la planta (Kirkham, 2006; citado en Saad *et al.* 2009) y contar con capacidades ecológicas amplias, que le permitan adaptarse a la amplia gama de condiciones ambientales de los suelos contaminados.
2. Elegir plantas cosmopolitas⁷, vigorosas y productivas, con capacidades agronómicas⁸ bien conocidas y adicionalmente si es posible las características bioquímicas necesarias para el empleo de ingeniería genética.

⁷ *Cosmopolitas*: aquellas que están aclimatadas a todos los países o que puede vivir en todos los climas.

⁸ *Capacidades agronómicas*: propiedades que mejoran la calidad de los procesos de la producción agrícola.

Por otro lado US EPA (2000) y el ITRC (2001) en sus documentos abordando Factores técnicos para los sistemas de fitorremediación, manifiestan que la selección de una planta con capacidades fitorremediadoras se puede determinar luego de conocer las condiciones específicas del sitio contaminado, estas especies pueden seleccionarse de las ya existentes en el sitio contaminado y evaluar su capacidad de fitorremediación, o de especies nativas de la región, de las especies reportadas en la literatura como fitorremediadoras o a la vez según investigaciones recientes de híbridos o especies genéticamente manipuladas.

Una vez localizadas las plantas prometedoras, el siguiente reto es aprender a cultivarlas, aunque la mayoría de los estudios de fitorremediación realizados con especies silvestres utilizan plantas colectadas en campo, no las cultivan; contar con un sistema de reproducción eficiente es una condición indispensable para utilizar estas especies en campo ya cuando fuese necesario (Saad *et al.* 2009).

2.2.14. *Eliminación del Material Vegetal*

Miller (1996) recomienda que concluido el proceso de fitorremediación, la eliminación del material vegetal puede ser no necesaria en el caso que se degraden los contaminantes a compuestos no tóxicos; pero si la planta ha acumulado los contaminantes, los brotes y las raíces de estas plantas pueden ser cosechadas (retiradas); sin embargo, los métodos de eliminación o tratamientos posteriores dependen de la toxicidad de los productos finales de la planta, los lugares de almacenamiento y las concentraciones relativas de los contaminantes en los tejidos vegetales.

El proceso más común de eliminación de plantas hiperacumuladoras es la incineración controlada, siendo necesario desarrollar luego un método económicamente viable de recuperación del contaminante de esta ceniza, reduciendo así aún más los impactos ambientales de esta tecnología; los métodos de eliminación convencionales como el relleno pueden ser útiles en algunos casos (Miller, 1996).

2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LAS PLANTAS UTILIZADAS

Las cuatro especies que se describen a continuación fueron identificadas en la Sección Botánica del Herbario Nacional del Ecuador el 20 de Octubre de 2010.

2.3.1. *Mimosa polydactyla* Humb & Boonpl. ex Will

Hábito: Hierba terrestre. *Origen:* Nativa.⁹

Nombres comunes: Dormilona, sensitiva (castellano), kánumar (shuar chinchán)¹⁰, amor dormido¹¹.

Etnias que la conocen y usan: Cofán, Kichwa del Oriente, Wao, Shuar.¹²

Cuadro 2. Taxonomía de *Mimosa polydactyla*.

Información Taxonómica	
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Mimosaceae ¹³
Género	<i>Mimosa</i>
Epíteto específico	<i>polydactyla</i>
Nombre Científico	<i>Mimosa polydactyla</i>
Autor del nombre	Humb. & Bonpl. ex Willd.

Fuente: adaptado de: Instituto de Biología. 2009. *Mimosa polydactyla* Humb. & Bonpl. ex Willd. UNIBIO. Colecciones Biológicas.

⁹ De La Torre L. *et al.* 2008. Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador, Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus. p. 353.

¹⁰ Idem

¹¹ Ayala, F. 2003. Taxonomía vegetal, Gymnospermae y Angiospermae de la Amazonia Peruana, Iquitos- Perú. vol 1, p. 295.

¹² De La Torre L, *et al.*, Op. Cit. p 353

¹³ The New York Botanical Garden. 1995. Taxonomy details. Consultado desde: <http://sweetgum.nybg.org/vh/taxon.php?irn=145892>

Descripción Botánica

Cerón (1995) describe a *Mimosa polydactyla* como un subarbolito de 1 m aproximadamente de alto, por otro lado Martínez *et al.* (2008) mencionan que es una planta rastrera o trepadora, con ramas jóvenes y maduras estriadas, largamente hispídas¹⁴, con aguijones infraestipulares pareados, recurvados, dispuestos irregularmente en los entrenudos. La vida de esta especie es corta: 4-5 años (Infojardin, s.f.).

Las *hojas* son bipinnadas¹⁵ con foliólulos diminutos (Cerón, 1995), éstas según Martínez *et al.* (2008) tienen estípulas¹⁶, estriadas, el margen largamente hispido; el pecíolo que las sostiene mide de 3.5-5.5 cm de largo; el raquis primario largamente hispido y tomentuloso¹⁷, inerme¹⁸; las pinnas (foliolos) (2-) 3-4 (-5) pares digitados; los foliólulos (20-) 22-30 (-40) pares por pinna, miden de 4-12 mm de largo, oblicuamente lineares, glabros en ambas superficies, el envés con nervación prominente, el ápice apiculado a mucronado¹⁹.

Los capítulos²⁰ (cabezuelas) de las inflorescencias miden de 1.0-1.2 cm de diámetro, constan de 120-150 flores, estas son axilares, las brácteas²¹ pueden llegar a ser del tamaño de la corola, son angostamente lanceoladas, glabras, el margen espaciado (Martínez *et al.* 2008).

Las *flores* son pequeñas van de blancas a violetas (Cerón, 1995) y según Martínez *et al.* (2008) son bisexuales, sésiles; 4 estambres, los filamentos libres, de color lila; ovario sésil y setoso²².

¹⁴ *Hispida*: cubiertas por pelos largos rígidos y gruesos.

¹⁵ *Pinnadas*: subunidades o pinnas (foliolo) dispuestas a lo largo de un eje o raquis.

¹⁶ *Estípula*: especie de hojas diminutas que se encuentran en el punto en donde la base del pecíolo de la hoja se une con la ramita.

¹⁷ *Tomentuloso*: ligeramente *tomentoso* (con pelos finos, suaves, cortos y entrecruzados (terciopelo)).

¹⁸ *Inerme*: No armado, sin espinas.

¹⁹ *Macranodo*: Provisto de mucrón: punta corta, más o menos aguda y aislada.

²⁰ *Capítulo*: Inflorescencia formado por numerosas flores en el centro y rodeadas de otras flores en el margen que suelen presentar diferente forma y color. El conjunto semeja una flor.

²¹ *Brácteas*: Hojas que nacen del pedúnculo de las flores de ciertas plantas, y suele diferir de la hoja verdadera por la forma, la consistencia y el color.

²² *Setoso (a)*: con setas (tricomos rígidos y punteagudos, como cerdas largas)

Figura 3. Hoja de *Mimosa polydactyla*



Fuente: Autora.

El *fruto* es una legumbre con pequeñas espinas tiene de 3-4 semillas (Cerón, 1995); las valvas²³ largamente setosas, sésiles a muy cortamente estipitadas²⁴; las semillas miden de 3.0-3.5 mm de largo, 2.3-2.5 mm de ancho, 1.0-1.5 mm de grosor, lenticulares, la testa ocre, porosa, la línea fisural de 90% de extensión (Martínez *et al.* 2008).

Las *raíces*, según una descripción generalizada de las leguminosas, presentan un predominio del sistema primario (que proviene de la radícula del embrión). La raíz primaria de muchas leguminosas, se convierte en sistema ligero y alargado, justamente debajo de la superficie del suelo, lo cual beneficia a la planta durante las sequías muy prolongadas (Machado, s.f..).

Además, Martínez *et al.* (2008) manifiestan que *Mimosa polydactyla* está estrechamente relacionada con *M. púdica*, por lo que se adapta a continuación una pequeña descripción de una característica común de estas dos especies explicada por Carmona *et al.* (2008) para *M. púdica*, donde dicen que pertenece al grupo de las plantas sensitivas, es decir que cuando son rozadas sus hojas se pliegan y cuando reciben un roce más fuerte, se doblan totalmente hacia abajo, con la finalidad de librarse de ser comidas por los rumiantes, pues al plegarse enseñan sus espinas, en media hora vuelven a su estado inicial.

²³ *Valva*: cada una de las divisiones profundas de las cápsulas propiamente dichas, de las legumbres, y de otros frutos secos y dehiscentes.

²⁴ *Estipitadas*: con tallo que en su base tiene una especie de pie o soporte.

Uso social: De La Torre *et al.* (2008) mencionan que la planta entera y/o las hojas se usan para inducir el sueño, especialmente en niños, quienes son “limpiados” ritualmente con la planta en la cultura Shuar de Orellana. En las etnias Cofán de Sucumbíos y Wao de Napo utilizan la planta hirviéndola y para bañar a los niños cuando lloran, entonces cesan de llorar y duermen tranquilos.

Distribución: México, Centroamérica (Costa Rica y Panamá) y Sudamérica (Argentina, Brasil, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa, Guyana, Perú, Surinam y Venezuela) (Martínez *et al.* 2008). En el Ecuador es nativa de las regiones Andina y Amazónica, su distribución se ha observado en las provincias de Carchi, Morona Santiago, Napo, Pastaza y Sucumbíos, a alturas entre 0 a 2000 msnm (Jørgensen y Leon, 1999).

2.3.2. *Ludwigia peruviana* (L.) H. Hara

Hábito: Hierba terrestre, subarbusto o arbusto. *Origen:* Nativa²⁵

Nombre común: Escoba, escobilla²⁶

Cuadro 3. Taxonomía de *Ludwigia peruviana*.

Información Taxonómica	
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Myrtales
Familia	Onagraceae
Género	<i>Ludwigia</i>
Epíteto específico	<i>peruviana</i>
Nombre Científico	<i>Ludwigia peruviana</i>
Autor del nombre	(L.) Hara, 1953

Fuente: Instituto de Biología. 2008. *Ludwigia peruviana* (L.) Hara. UNIBIO: Colecciones Biológicas.

²⁵ De La Torre *et al.*, Op. Cit. p. 475.

²⁶ Según moradores de la comunidad de San Luis del sector Piedra Fina del cantón El Chaco, Prov. Napo-Ecuador.

Descripción Botánica

Stevens *et al.* (2001) indican que estas plantas son hierbas perennes o arbustos, erectos, con tallos redondeados o angulosos; tiene un crecimiento rápido terrestre o parcialmente sumergidos, miden generalmente hasta 4 m de altura. *Hojas* alternas, lanceoladas, raramente ovadas o redondeadas, 2-15cm de largo y 2-4 cm de ancho, vellosas; sésiles o con peciolo de hasta 1.5 cm de largo; pedicelos²⁷ 5-65 mm de largo; sépalos 4 (-5), ovado-lanceolados, 10-23 mm de largo, vellosos o glabros.

Las *flores* solitarias son de color amarillo brillante, con 4-5 pétalos (Strathfield Council, s.f.), de 2 a 4 cm de diámetro, muy vistosas y bisexuales (NBII *et al.* 2006), con 8 (-10) estambres según Stevens *et al.* (2001). Nacen de las axilas de las hojas en el ápice de los tallos (Australian Weeds Committee, s.f.).

Las *frutas* tienen forma erguida en ángulo recto contienen 4 cápsulas con alrededor de 1000-3000 semillas pegajosas (Strathfield Council, s.f.); los frutos miden 1-2.5 cm de largo, 0.6-1 cm de ancho; con apertura irregular en la madurez; las *semillas* están dispuestas en hileras longitudinales son pequeñas como la arena (Australian Weeds Committee, s.f.), de color marrón claro, subglobulares (NBII *et al.* 2006).

Los *tallos* son de color marrón verde, muy ramificado, y peludo cuando son jóvenes (NBII *et al.* 2006).

Las *raíces* son fibrosas (raíces delgadas sin distinción clara de una raíz principal, no ramificada) y poco profundas (Australian Weeds Committee). El sistema radicular se compone de una raíz leñosa con laterales cerca de la superficie (NBII *et al.* 2006).

L. peruviana se ha introducido como ornamental por sus flores vistosas y llamativas, sin embargo, una vez establecida tiende a formar bosques monotípicos; expandiéndose también en el agua donde pueden formar islas flotantes de vegetación, pudiendo llegar a obstruir las vías navegables; sin embargo las pequeñas islas flotantes pueden proporcionar refugio para aves acuáticas (NBII *et al.* 2006). Se puede llegar a

²⁷ *Pedicelos*: cabillo o columna carnosa individual que sostiene una flor.

considerarse a esta especie como a una maleza oportunista vigorosa (Strathfield Council, s.f.), por lo que se debe tener precaución, pues se podría diseminar y en un caso extremo podría conducir a la pérdida de plantas nativas.

Dispersión de semillas: Probablemente propagada por las aves, pues sus semillas son fácilmente adheribles a las plumas; las semillas germinan en 4 días en aguas poco profundas o el lodo (Australian Weeds Committee, s.f.). La germinación puede estar limitada por la profundidad del suelo, pues como cita la NBII *et al.* (2006): "La investigación ha demostrado que las semillas no germinan por debajo de unos 5 cm de arena"; además, menciona que se limita la germinación de estas semillas en la sombra en áreas con árboles o arbustos grandes; sin embargo los tallos caídos puede producir nuevos brotes, y echar raíces.

Distribución y cultivo: Originarios de Centro y Sur América. (Strathfield Council, s.f.). Es común en áreas húmedas alteradas, y fue introducida en Asia, en Australia (Stevens *et al.* 2001). En el Ecuador es nativa las regiones Costa y Andina, su distribución se ha observado en las provincias de Chimborazo, El Oro, Guayas, Loja, Pastaza, Zamora, en alturas entre 0 a 3000 msnm (Jørgensen y Leon, 1999).

2.2.3. *Tessaria integrifolia* Ruiz & Pav.

Hábito: Arbusto, arbolito o árbol.²⁸ *Origen:* Nativa.²⁹

Nombres comunes: "Nanavi waska (kichwa-lengua no especificada), álamo, balsa, mangle, olivo, palo bobo (castellano)"³⁰, pájaro bobo.³¹

Etnias: Cofán.³² *Nombre científico:* *Tessaria integrifolia* Ruiz & Pav

²⁸ De La Torre L, Op. Cit. p. 237

²⁹ Idem

³⁰ Idem

³¹ Ayala, Franklin, Op. Cit. p. 696.

³² De La Torre L, Op. Cit. p. 237

Cuadro 4. Taxonomía de *Tessaria integrifolia*.

Información Taxonómica	
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Tessaria</i>
Epíteto específico	<i>integrifolia</i>
Nombre Científico	<i>Tessaria integrifolia</i>
Autor Epíteto Específico	Ruiz & Pav.

Fuente: Instituto de Ciencias Naturales. 1989. *Tessaria integrifolia* Ruiz & Pav. – Asteraceae.

Descripción Botánica

Tessaria integrifolia Ruiz & Pavón, según Pérez *et al.* (2007), es un arbusto o árbol perenne de 3-10 m de alto, *tallos* delgados, más o menos cilíndricos, verdes o verdoparduscos, lenticelados, poco ramificados, glabros o diminutamente puberulentos cuando jóvenes. Además, son perennifolios con troncos rectos; copa pequeña; corteza grisácea, lisa a rugosa (Atlas de Buenos aires).

Hojas alternas, simples, pubescentes (Atlas de Buenos aires); oblongas o lanceoladas, obtusas hasta agudas en el ápice, atenuadas y pecioliformes en la base, enteras, de 3-8 cm de largo (Pérez *et al.* 2007).

Capítulos blancuzcos discoideos, pequeños (3-3.5mm de largo), numerosos, subsésiles, dispuestos en densos corimbos³³ (Pérez *et al.* 2007); se ubican en el extremo de los tallos (Ibarra *et al.* 2003). Flores dimorfas, las marginales femeninas numerosas, con corola filiforme glabra, las flores centrales tubulosas masculinas

³³ *Corimbos*: inflorescencias constituidas por un eje alargado del que parten los ejes secundarios, siendo éstos más largos cuanto más abajo están insertados de modo que las flores vienen a quedar casi a la misma altura.

(esterilidad del gineceo), glabra, (Ibarra *et al.* 2003); la corola mide unos 5 mm de longitud; estambres exertos³⁴ (Pérez *et al.* 2007).

El *Fruto* es un Aquenio, estos son gruesos, glabros, de 0.5-0.8 mm de longitud (Pérez *et al.* 2007).

Sistema radical pivotante, con raíces profundas, acompañadas con raíces gemíferas³⁵, plagiótropas³⁶ y cercanas a la superficie del suelo (adaptado de: Irazusta, 2009).

Usos según De La Torre *et al.* (2008).

- Uso alimenticio para vertebrados, como forraje de animales (Etnia no especificada-Imbabura) y uso apícola (Etnia no especificada-Loja).
- Uso como combustible, empleando el tallo (Etnia no especificada-Imbabura, Tungurahua).
- Uso como materiales, el tallo es maderable, se usa en la construcción de los techos de las viviendas (Etnia no especificada-Imbabura, Tungurahua; Cofán-Sucumbíos). Además, en el Atlas de Buenos aires manifiesta que la madera es apta para pastas de papel y construcciones rústicas; sus cenizas sirven para elaborar jabón. Y según Vargas (2002, citado en Red Nacional de Jardines Botánicos de Colombia, 2008) sirve para la elaboración de pólvora.
- Uso medioambiental, la planta ayuda a evitar la erosión (por lo general se encuentra en barrancos) y estabiliza los bancos de ríos (Cofán-Sucumbios; Etnia no especificada-Esmeraldas, Guayas, Sucumbíos); también se usa como cerca viva (Etnia no especificada-Tungurahua).

Distribución: es una especie nativa de Sudamérica cálida, hasta el norte y centro de la Argentina, en bordes de cursos de agua; es pionera en la consolidación de islas, se multiplica rápidamente por raíces gemíferas (Atlas de Buenos aires). En Ecuador esta especie es nativa de la región Andina y Amazónica, su distribución se ha observado en

³⁴ *Estambres exertos:* disposición de los estambres en el androceo, cuando los filamentos son más largos que la longitud de la corola y sobresale a esta.

³⁵ *Raíces gemíferas:* productoras de raíces o yemas de raíces adventicias que permiten la propagación vegetativa de la planta (Ejemplos: *Linaria vulgaris*, *Rumex acetosella*, *Populus sp.*).

³⁶ *Plagiótropas, plagiotropismo:* Que tiene el eje mayor no coincidente con el vertical; se aplica a plantas que crecen en sentido transversal respecto al estímulo gravitatorio. Que presenta crecimiento con dirección horizontal o en ángulo.

las provincias de Carchi, Chimborazo, Imbabura, Loja, Los Ríos, Morona, Napo, Pastaza, Pichincha, Sucumbíos y Tungurahua, sobre alturas entre 0-3500 msnm según Jørgensen y Leon (1999).

2.3.4. *Verbena litoralis* Kunth

También citada como: *Verbena brasiliensis*.³⁷

Hábito: Hierba terrestre o arbusto.³⁸ **Origen:** Nativa, Cultivada.³⁹

Nombres comunes: Verbena, verbena del campo, verbena fina, hierba de todos los males, verbena blanca, yapo, wirwina, yerba de los hechizos, biribina (shipibo-conibo), Tahua (Siona).⁴⁰ Bibina, berebena (tsafi'ki), warmi verbena (castellano-kichwa), yapá (shuar chicham), hierba buena, hierba de faraón, hierba mora de costa, moradilla macho, verbena azul.⁴¹

Etnias: Awa, Chachi, Tsa'chi, Kichwa de la Sierra, Secoya, Siona, Kichwa del Oriente, Shuar, Mestiza.⁴²

Nombre científico: *Verbena litoralis* Kunth.⁴³

Cuadro 5. Taxonomía de *Verbena litoralis*.

Información Taxonómica	
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Verbenaceae
Género	<i>Verbena</i>
Epíteto específico	<i>litoralis</i>
Nombre Científico	<i>Verbena litoralis</i>
Autor Epíteto Específico	Kunth

Fuente: Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. *Verbena litoralis* Kunth. UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2007.

³⁷ De La Torre L, Op. Cit. p. 618.

³⁸ Idem

³⁹ De La Torre L, Op. Cit. p. 618.

⁴⁰ Serkovic, Santos, “*Verbena littoralis* H.B.K. y *V. officinalls* H.B.K”

⁴¹ De La Torre L, Op. Cit. p. 618.

⁴² Idem.

⁴³ Idem.

Descripción Botánica

Hierba siempre verde, aromática, lisa (Matthei, 1995); es perenne o semileñosa, mide hasta 1 metro de alto, puede ser cultivada en cualquier época del año (Sarango, 2008). Sus *tallos* erectos ramificados, cuadrangulares, glabros o escabrosos en los ángulos (Ibarra *et al.* 2003).

Hojas opuestas, enteras, oblongo-lanceoladas, base atenuada, márgenes irregularmente aserrados, de 4-11 cm de largo por 0.5-1.5 cm de ancho (Matthei, 1995). Además, son subsésiles, agudas o acuminadas en el ápice (Ibarra *et al.* 2003).

Inflorescencia con espigas cilíndricas, primero cortas y luego muy largas, de 1.5-10 cm de largo por 4 mm de diámetro, las *flores* son pequeñas de 3-3.5 mm de longitud. (Matthei, 1995), la corola gamopétala 5-lobada, azul o violácea, pubescente; los estambres 4 didínamos; Ovario súpero (Ibarra *et al.* 2003).

Fruto seco, protegido por el cáliz, al madurar se disgregan 4 pequeñas nueces lineales, rojizo-oscurecidas, de 1,5 - 2 mm de longitud (Matthei, 1995).

Raíz pivotante (Zuñiga, A. y S. Ortiz. s.f.)

Usos que se le da según De La Torre *et al.* (2008)

- *Usos alimenticios*, la infusión de las hojas se toma como una bebida refrescante (Kichwa de la Sierra-Chimborazo; Shuar-Napo); se usa como forraje de animales, especialmente de cuyes (Etnia no especificada-Bolívar, Azuay).
- *Materiales*, la decocción de las hojas estimula el crecimiento del cabello (Etnia no especificada (Región Costa)); se utiliza como escoba (Etnia no especificada-Zamora Chinchipe); combate la caspa (Etnia no especificada-Tungurahua).
- *Uso social*, la infusión de la planta se bebe para tratar el susto (Etnia no especificada-Azuay). Corta tratamientos abortivos (Mestiza-Pichincha). Junto con otras hierbas, se barre para echar los malos espíritus (Etnia no especificada-Pichincha). Usada en limpiezas (Etnia no especificada-Otras (Región Costa)).

Distribución: Crece en climas cálidos y templados, invade campos de cultivo (Ibarra *et al.*, 2003). Según Jørgensen y Leon (1999), ésta especie es nativa de las regiones de Galápagos, Costa, Andina y la Amazonía; su distribución en Ecuador se ha observado

en las provincias de Azuay, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, El Oro, Galápagos, Guayas, Imbabura, Loja, Los Ríos, Morona, Napo, Pastaza, Pichincha, Tungurahua y Zamora, sobre alturas entre 0 - 4000msnm.

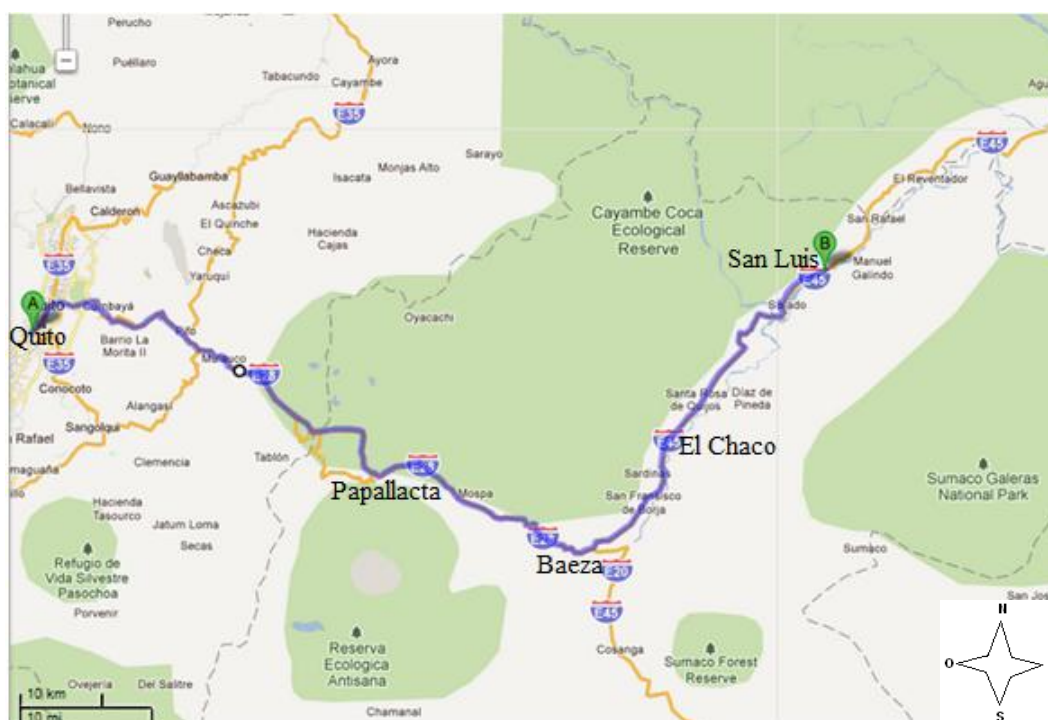
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDIO Y SELECCIÓN DE ESPECIES

Se seleccionaron cuatro especies vegetales nativas de la región andino-amazónica (Anexos 1 y 2), procedentes del sector Baeza-El Chaco (Figura 4), que mostraron tolerancia a derrames de petróleo, en vista de su presencia persistente en zonas con estos eventos reportados.

Se instaló un ambiente controlado de lluvia e insolación excesiva, en la comunidad de San Luis, Cantón El Chaco, con el objetivo de comprobar la tolerancia y potencial de fitorremediación a hidrocarburos en suelo por parte de las cuatro especies descritas en el Capítulo 2. Se evaluó el crecimiento de las mismas a través de un monitoreo periódico.

Figura 4. Mapa de la Hoya del Quijos y de la ubicación de la comunidad de San Luis.



A= Quito.

B= Comunidad de San Luis, Cantón el Chaco, Provincia de Napo.

Distancia A-B = 153km aproximadamente.

Fuente: adaptado de <http://maps.google.com/>

3.2. IMPLEMENTACIÓN DE TRATAMIENTOS DE FITOREMEDICIÓN EN EL SITIO DE TRABAJO

El sitio de trabajo se implementó como un sistema con algunas condiciones ambientales semi-controladas, con la finalidad de eliminar interferencias no deseadas (excesos de agua por lluvias, exagerada insolación, etc.) y de difícil interpretación en la investigación. Se registraron los cambios o sucesos que se dieron en las plantas como indicativo de que fue posible o no la fitorremediación. En el Anexo 6 se presentan las imágenes de la instalación del sitio de trabajo.

3.2.1. *Determinación sistemática de posibles especies vegetales bio-rremediadoras*

Cuatro especies fueron seleccionadas de entre las especies nativas observadas con mayor población (un indicio indirecto de tolerancia) en sitios contaminados con petróleo (según la metodología recomendada por US EPA, 2000 e ITRC, 2001; citados por Maqueda, 2003) a diferentes concentraciones (desde sitios en proceso de remediación hasta un estanque de petróleo crudo). Se realizaron tres salidas de campo en mayo de 2010, a zonas con derrames de petróleo reportados en los últimos años, para determinar las especies más prometedoras para la investigación, se visitaron los lugares de Papallacta (alrededores de la Laguna de Papallacta), Baeza (comunidad Cuyuja), El Chaco (sector Piedra Fina). En este último se visitaron dos comunidades del Sector de Piedra Fina, eligiéndose al final a la comunidad de San Luis como el sitio para la instalación del ambiente controlado de lluvia e insolación, con coordenadas UTM 18M 0209359, 9'985446, a 1296 msnm.

3.2.2. *Características del diseño experimental*

a. Población: en el Cuadro 6 se presenta la distribución y las condiciones a las cuales se sometió a los individuos de las especies vegetales para determinar su capacidad de tolerancia y fitorremediación.

b. Muestras: el número de plantas recolectado para aplicar los tratamientos fue de 24 por especie, de las cuales se designaron 4 para cada tratamiento en la mayoría de ellos. El fundamento del tamaño mínimo de la muestra elegida para este experimento, se basa que, el tamaño de una muestra está supeditado a dos factores:

- 1) Precisión estadística de los resultados y conclusiones que se generan en el experimento; bajo este argumento el tamaño de la muestra tendería a ser mucho mayor mientras más precisión se busque, y
- 2) Aquel definido por las condiciones logísticas disponibles para realizar el experimento; en las que se incluye: costos y tiempo involucrados en los procesos, y la facilidad de obtención de las plantas. Por cuanto las plantas son comunes en las zonas de trabajo esta tercera característica es despreciable si se analizan logísticamente, primando los costos y el tiempo al desarrollar el experimento.

Cuadro 6. Diseño experimental aplicado (a)

TRATAMIENTOS							
No.	ESPECIE	Suelo sin Fertilizar			Suelo con Fertilizante (b)		
		No. de Plantas en suelo sin contaminante	Plantas en suelo con 3% de Petróleo	Plantas en suelo con 6% de Petróleo	No. de Plantas en suelo sin contaminante	Plantas en suelo con 3% de Petróleo	Plantas en suelo con 6% de Petróleo
1	<i>Ludwigia peruviana</i>	4	4	4	4	4	4
2	<i>Mimosa polydactyla</i>	4	4	4	4	4	4
3	<i>Tessaria integrifolia</i>	4	4	4	4	4	4
4	<i>Verbena litoralis</i>	4	4	4	4	4	4
5	Sin especie vegetal (Control)	0	2	2	0	2	2

(a) En cada celda se menciona el número de bolsas plásticas con suelo procedente de San Luis y bajo las condiciones experimentales determinadas por las columnas y filas.

(b) El fertilizante usado fue orgánico líquido “Bioplus” (<http://dspace.esPOCH.edu.ec>).

3.2.3. Obtención del sustrato

Previo al uso del suelo se llevó a cabo un análisis de su grado de contaminación por hidrocarburos de petróleo (Anexo 4), con la finalidad de asegurar la eficacia del proceso de fitorremediación. Este suelo procedió de la comunidad San Luis del cantón El Chaco (20cm bajo la superficie). Se tamizó el suelo (450 kg aproximadamente) sobre una malla de gallinero antes de ser utilizado para eliminar las gravillas y la mayoría de restos de material vegetal, se homogeneizó todo el material, y se extrajeron varias submuestras para caracterizarlo con pruebas físico-químicas (Anexo 3) de acuerdo a lo recomendado por Luque (2009).

3.2.4. Obtención del contaminante (petróleo)

La cantidad de crudo de petróleo utilizado como elemento contaminante del suelo fue de aproximadamente 20 litros (repartidos en las bolsitas experimentales de acuerdo al diseño experimental enunciado), el mismo que fue donado por la Empresa Petrolera OCP.

3.2.5. Preparación del sustrato

Se pesó 4 kg de suelo por cada tratamiento establecido en el diseño experimental colocándolos en fundas negras adecuadas para cultivo (no perforadas), con 5 litros de capacidad.

Para los tratamientos con contaminación simulada de 3 y 6% se trasvasó los 4 kg de suelo pesado a una bandeja, aquí se vertió 120 o 240 g de petróleo según correspondía a cada tratamiento, se mezcló manualmente hasta la homogeneidad (adaptado de Méndez *et al.* 2004), y finalmente se volvió a ubicar este suelo contaminado en las fundas de cultivo.

Los desechos generados de este proceso se los incineraron para evitar contaminación en la basura común. En el Anexo 5 se presentan las imágenes de la preparación del sustrato.

3.2.6. Recolección de especies vegetales seleccionadas como posibles individuos bio-remediadores

Individuos vegetales silvestres de *Ludwigia peruviana*, *Mimosa polydactyla*, *Tessaria integrifolia* y *Verbena litoralis* fueron recolectados en el sector Piedra Fina y alrededores, cantón El Chaco, Provincia de Napo; se tomaron los especímenes vegetales de las cuatro especies de sitios libres de contaminación. Se realizó en una salida de campo de 3 días, en las fechas del 10 al 13 de agosto con la ayuda de: 2 colaboradores de la comunidad San Luis (lugar donde se instaló el ambiente controlado de lluvia), y el Investigador Ecólogo Patricio Yáñez. Las características tomadas en cuenta en las plantas recolectadas fueron: buen estado anatómico, robustez, color natural y ausencia de plagas (en lo posible). En el Anexo 7 se observan las imágenes de esta fase de la investigación.

3.2.7. *Trasplante y adaptabilidad de individuos vegetales posibles bio-remediadores a los Tratamientos de Fitorremediación*

Los individuos colectados en campo libre de contaminación, se trasplantaron hacia bolsas plásticas (no perforadas) de 5 litros que contenían el sustrato previamente preparado (14 días antes, según lo recomendado por Saad *et al.* 2009) con el contaminante a las concentraciones (0, 3 y 6%) establecidas en el diseño experimental. Este proceso se llevó a cabo en agosto de 2010 una semana después de la recolección de las plantas, pues se debía descartar la posibilidad de marchitamiento de las mismas por estrés. Se agregó también el fertilizante líquido orgánico Bioplus⁴⁴ a los tratamientos que correspondía según el diseño experimental. Posteriormente, en el transcurso y evolución del cultivo se realizaron riegos periódicos moderados (aproximadamente cada 3 días) a fin de mantener una humedad constante.

En los días posteriores al trasplante se tuvo especial atención a todo el sitio de trabajo recién establecido, teniendo en cuenta la adaptabilidad de las plantas a sus nuevas condiciones, además se realizó un riego periódico a fin de mantener una humedad constante eliminando el factor sequía. En el Anexo 8 se encuentran las imágenes de trasplante y rotulación de los tratamientos establecidos para el presente trabajo.

3.3. MÉTODOS UTILIZADOS PARA VERIFICAR LA DINÁMICA DE LA FITOREMEDIACIÓN

3.3.1. *Monitoreo y control de individuos vegetales*

La velocidad de crecimiento de una planta afecta directamente la velocidad de remediación, por lo que se podría decir que, los monitoreos periódicos miden el progreso de la remediación (US EPA, 2000 e ITRC, 2001; citados en Maqueda, 2003), es así que en esta fase se llevó un control y registro periódico (1 vez por semana o máximo cada 15 días) de la evolución de las plantas en los tratamientos establecidos en sitio de trabajo. Los datos registrados en cada observación fueron: altura de las plantas, dimensión y número de las hojas, eventos y días de floración-fructificación,

⁴⁴ <http://dspace.esPOCH.edu.ec>

estado general de las plantas y cambios morfológicos ocurridos. Debido al ataque de insectos se aplicó también un insecticida de alta intensidad “Monitor”⁴⁵.

En el Anexo 9 Monitoreo y control de individuos vegetales bio-remediadores se observan algunas imágenes de este proceso.

3.3.2. *Cualificación de la producción y crecimiento de raíces de las diferentes especies sobre suelos con y sin presencia de HC*

Previo a la preparación de las muestras de suelos (en las cuales se realizaron los análisis físico-químicos, al finalizar el tiempo de la investigación), se observó el crecimiento de las raíces dentro de los sustratos contaminados, pues al inicio de la investigación, el trasplante de las plantas recogidas en campo libre de contaminación, se lo hizo con una cantidad mínima de su sustrato natural (suelo sin contaminación en el que crecían las plantas silvestremente), con la finalidad de no dañar las raíces. Es decir, que al inicio del tratamiento las raíces de las plantas no estaban sumergidas directamente en el sustrato contaminado con petróleo.

Es así, que al final del ensayo se quitó cuidadosamente la bolsa de cada tratamiento (bolsa con sustrato contaminado, con la planta) y se observó si las raíces llegaban a la base del suelo y la bolsa plástica. Las imágenes de esta observación se presentan en el Anexo 10.

3.3.3. *Determinación de características físico-químicas del suelo al inicio y al final de la investigación*

Las características originales físico-químicas del suelo fueron determinadas de acuerdo principalmente a metodologías sugeridas por Fernández *et al.* (2006): humedad, pH, materia orgánica, textura, nutrientes (N, P y K; establecen la fertilidad en del suelo) y el contenido inicial y final (5 meses después: Anexo 11 y 12) de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs).

El resumen de la metodología aplicada para los análisis efectuados se presentan en el Cuadro 7; estos análisis fueron realizados en los laboratorios del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI) de la Universidad

⁴⁵ <http://www.proficol.com.co>

Politécnica Salesiana-Quito (las imágenes se pueden observar en los Anexos 3, 4, 10, 11 y 12) y en los laboratorios AGROCALIDAD y CENTROCESAL. Los análisis de todas las muestras se realizaron por duplicado; se preparó el suelo según la norma INEN 688, previo a la aplicación de los análisis (INEN, 1982).

Cuadro 7. Detalle de los métodos utilizados en la caracterización de los suelos.

Característica Edáfica analizada	Método	Referencia	Muestra (g)	Fórmula referencial
pH	Potenciométrico líquido	Willard <i>et al.</i> (1974); Bates (1983) (citados en Fernández <i>et al.</i> 2006)	5	---
% Humedad	Gravimétrico o de secado al Horno	Fernández <i>et al.</i> (2006); INEN 690 (1982); Llorca <i>et al.</i> (2004)	2-10	% Humedad del suelo = (Peso del agua / peso de suelo seco)*100
% M.O.	Gravimétrico deducido de cenizas	INEN 1 492 (1986)	1	C = (Peso de la ceniza obtenida / peso de muestra original)*100; y MO = 100 - C
TPHs	Gravimétrico diseñado para el efecto	Fernández <i>et al.</i> (2006); Noriega (2011)	5	HTPs (mg kg ⁻¹ de s.s.) = (RB – RA) * (FC) / (P * FH)
Textura	Prueba de tacto	Plastes (2005)	3-5	---
Color	Comparación en las tablas de colores de Munsell	Llorca y Bautista (2004)	2	---
% N	Correlación con la materia orgánica	LAB. AGROCALIDAD	---	---
P	Olsen	LAB. AGROCALIDAD	---	---
K	Fotométrico de llama	LAB. AGROCALIDAD	---	---

%MO= Porcentaje de Materia Orgánica; TPHs= Hidrocarburos Totales de Petróleo; %N= Porcentaje de Nitrógeno; P= Fósforo; K= Potasio.

Se describe a continuación en forma más detallada solo las técnicas aplicadas directamente por la tesista de la presente investigación en los laboratorios del

CIVABI, de los análisis realizados en laboratorios externos a la Universidad Salesiana, se describe solo el fundamento teórico.

a) *Determinación de pH.*

El pH es una propiedad química del suelo importante para el desarrollo de los seres vivos; se refiere a la concentración de iones hidrógeno activos (H^+) que se da en la interfase líquida del suelo, por la interacción de los componentes sólidos y líquido (Willard *et al.* 1974; Bates, 1983; citados en Fernández *et al.* 2006). Los agricultores se encuentran normalmente con rangos del suelo oscilantes entre los valores de pH 5,0-8,0; su importancia sobre las plantas es que tiene efecto en la disponibilidad de los nutrientes, ya que muchos elementos del suelo cambian de forma al producirse reacciones (controladas por el pH) en el suelo, y las plantas pueden ser capaces o no de usar elementos en sus formas cambiadas (Plastes, 2005).

Interferencias: Debido a que el pH del suelo es medido en una matriz acuosa, su valor depende del grado de dilución, así que un aumento causará un incremento en el pH, siendo necesario mantener la relación constante y tan baja como sea posible (Fernández *et al.* 2006). Los suelos con alta cantidad de materia orgánica tienden a formar una gruesa pasta seca, por lo que una relación menor de muestra en agua puede ser aceptable (1:5 o 1:10) (Karma, 1993; citado en Fernández *et al.* 2006).

Procedimiento

El método utilizado fue el potenciométrico líquido (Willard *et al.* 1974; Bates, 1983; citados en Fernández *et al.* 2006). Se pesó 5 g de suelo con la ayuda de una balanza analítica y una espátula, sobre un vaso de precipitación de 25 o 50ml (según disponibilidad de material), se agregó 10 ml de agua destilada, y se sometió a agitación durante 30 minutos en un agitador magnético. Se dejó reposar 10 minutos y con un potenciómetro previamente calibrado en soluciones tampón de pH 10, 7 y 4.

Calibración del pH-metro: se sumergió el electrodo en una disolución tampón de pH 4, agitando suavemente la disolución hasta que se estabilizó la lectura. Se sacó el electrodo y se limpió con agua destilada dispuesta en una pizeta, se secó con papel absorbente las paredes del electrodo y se sumergió en la disolución tampón pH 10

hasta que se estabilizo la lectura, se sacó limpio y seco nuevamente y se sumergió en la disolución de pH 7 hasta que se estabilizo la lectura (adaptado de Llorca *et al.* 2004).

Cuadro 8. Criterios de evaluación de un suelo con respecto a su pH (NOM-021-RECNAT-2000).

Categoría	Valor de p H
Fuertemente ácido	< 5.0
Moderadamente ácido	5.1 -6.5
Neutro	6.6 -7.3
Medianamente alcalino	7-4 - 8.5
Fuertemente alcalino	8.5

Fuente: Fernández *et al.* 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados.

Es importante mencionar que debido a que el potenciómetro del laboratorio del CIVABI no se encontraba en buen estado, al inicio de la investigación este análisis se realizó con tirillas de detección de pH.

b) *Determinación de Humedad.*

Fundamento: Fernández *et al.* (2006), menciona que el agua es esencial porque participa en varias reacciones metabólicas celulares, actúa como un solvente y portador de nutrimentos desde el suelo hasta las plantas y dentro de ellas. Además, ioniza los macro y micronutrientes que las plantas toman del suelo, y permite que la materia orgánica sea fácilmente biodegradable.

Procedimiento

El método utilizado fue el gravimétrico, para determinar únicamente la cantidad de agua de los suelos (Fernández *et al.* 2006) o también denominado según la INEN 690 1982-05 como Método de secado al Horno. Se pesó 2, 5 o 10g de muestra (dependiendo del tamaño de la cápsula) en una balanza analítica, sobre una cápsula de porcelana a peso constante, ésta se colocó dentro de una estufa, con la ayuda de una pinza, a 105°C de temperatura durante de 24 horas (Llorca *et al.* 2004). Transcurrido este tiempo se sacó la cápsula de la estufa con la pinza y mucho cuidado, y se la dejó enfriar en un desecador por un periodo de 30 minutos, posteriormente se pesó la

cápsula con la muestra seca y se volvió a colocar la cápsula en la estufa a la misma temperatura durante 2 horas, se dejó enfriar en las condiciones ya mencionadas y se pesó nuevamente, para comprobar que la muestra estuviese a peso constante. Finalmente se calculó los porcentajes de humedad en el suelo por la diferencia de pesos, con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad del suelo} = (\text{Peso del agua} / \text{peso de suelo seco}) * 100$$

Lo que también según la INEN 690, 1982-05 se puede expresar así:

$$w = \frac{m2 - m3}{m3 - m1} * 100$$

donde:

w = contenido de agua, en %.

m1 = masa del recipiente, en g.

m2 = masa del recipiente, y el suelo húmedo, en g.

m3 = masa del recipiente y el suelo seco, en g.

c) *Determinación de Materia orgánica.*

La materia orgánica mejora las condiciones de todos los suelos, pues ayuda a los suelos arenosos incrementando su capacidad de retención de agua y nutrientes, a los suelos arcillosos soltándolos y mejorando su laboreo; previene la erosión al mejorar la infiltración del agua (Plastes, 2005).

Procedimiento

El método utilizado fue el gravimétrico deducido de cenizas adaptado de la INEN 1 492 1986-11. Se taró el crisol (recipiente) en una mufla a 600°C durante 1 hora, se sacó con la ayuda de una pinza y se dejó enfriar por 30 minutos en un desecador provisto de sílica gel activada, y se peso. A continuación se pesó 1 g de suelo sobre el crisol tarado, en una balanza analítica, y se calentó en un mechero de bunsen hasta que el contenido se inflamó. Se colocó los crisoles en la mufla a 600°C durante 2 horas. Se retiró de la mufla y se dejó enfriar a temperatura ambiente en el desecador durante 30 minutos. Se pesó el crisol con las cenizas en frío. Finalmente se calculó los porcentajes

de cenizas totales y de Materia Orgánica en el suelo por la diferencia de pesos, con las siguientes fórmulas:

$$C = (\text{Peso de la ceniza obtenida} / \text{peso de muestra original}) * 100$$

$$C = \frac{m3 - m1}{m2 - m1} * 100$$

C = % Cenizas del suelo

m1= crisol vacío

m2 = crisol con suelo

m3 = crisol con cenizas

y

$$MO = 100 - C$$

MO= Materia Orgánica

d) *Determinación del grado de contaminación del suelo por TPHs
(Hidrocarburos totales del petróleo)*

Se aplicó el Método Gravimétrico (Cuadro 7): colocando a peso constante los vasos de precipitados de 50 ml (allí se vertió el extracto orgánico obtenido al final del ensayo), estos recipientes se conservaron en un desecador. Se pesó 5 g de suelo en un matraz de 50 ml con tapa; dentro de una cámara de flujo laminar se añadieron 25 ml de Diclorometano (disolvente) más un imán de agitación; se colocó la tapa al matraz y se agitó en un agitador magnético durante 45 minutos. A continuación se filtró la mezcla en un filtro al vacío, el extracto se trasvasó al recipiente de peso constante preparado al inicio y se dejó evaporar en la cámara de flujo laminar durante 24 horas, para asegurar la evaporación del solvente se colocó en una estufa a 40°C por 6 horas, se dejó enfriar en un desecador y se pesó.

Para el cálculo de concentración de hidrocarburos totales del petróleo provenientes de las muestras, se consideró la cantidad de suelo que se pesó para la extracción, así como la humedad de la muestra; finalmente se aplicó la siguiente fórmula propuesta para el método “Soxhlet” por Fernández *et al.* (2006):

$$\text{TPHs (mg kg}^{-1} \text{ de s.s.)} = (\text{RB} - \text{RA}) * (\text{FC}) / (\text{P} * \text{FH}).$$

Dónde:

TPHs (mg kg⁻¹ de s.s.) = hidrocarburos totales del petróleo en mg/kg de suelo seco.

RA= peso (mg) del recipiente vacío a peso constante.

RB = peso (mg) del recipiente con el extracto orgánico concentrado.

P = cantidad de suelo extraído (g).

FH = factor de corrección de humedad (1-(%humedad/100)).

FC = factor de transformación a kg de s.s. = 1 000.

La perspectiva de la fitorremediación de este ensayo se basa en que los resultados de este análisis estén dentro de los límites permisibles de hidrocarburos en suelos, para lo cual, se tomaron en cuenta las disposiciones establecidas en la legislación ecuatoriana como se cita en el siguiente cuadro:

Cuadro 9. Límites permisibles de hidrocarburos en suelos.

Parámetro	Expresado en	Unidad 1)	Uso agrícola 2)	Uso industrial 3)	Ecosistemas sensibles 4)
Hidrocarburos totales	TPH	mg/kg	< 2500	< 400	< 1000
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)	C	mg/kg	< 2	< 5	< 1
Cadmio	Cd	mg/kg	< 2	< 10	< 1
Níquel	Ni	mg/kg	< 50	< 100	< 40
Plomo	Pb	mg/kg	< 100	< 500	< 80

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

Fuente: Ministerio de Energía y Minas, RAOHE, Decreto No. 1215, Instructivo para la Calificación y Registro de Consultores Ambientales Hidrocarburíferos, Tabla 6.

e) *Determinación de Textura*

La textura del suelo es la proporción relativa por tamaños de partículas de arena, limo y arcilla; las cuales al combinarse permiten categorizar al suelo en una de las 12 clases texturales (Fernández *et al.* 2006). Los suelos normalmente están formados por más de una fracción de suelo; las tres fracciones se encuentran todas en la mayoría de los suelos: la textura determina la forma en la que el agua se comporta en el suelo, así los

suelos toscos están probablemente más necesitados de una frecuente irrigación; siendo de esta manera que, para la mayoría de los propósitos, los agricultores consideran los suelos medios como los ideales (Plastes, 2005).

Cuadro 10. Tamaño de las partículas y características de las fracciones de arena, limo y arcilla en la clasificación del departamento de los Estados Unidos (U.S.D.A.).

Fracción	Diámetro (mm)	Características de la fracción
arena	< 2.5 - 0.05	Áspera al tacto. Ni plástica ni pegajosa al humedecerse.
limo	< 0.05 - 0.002	Suave y sedoso al tacto como el polvo de talco mojado. Ni plástica ni pegajosa al humedecerse.
arcilla	< 0.002	Suave al tacto. Plástica y pegajosa cuando se humedece. Propiedades coloidales.

Fuente: Plastes, 2005. La Ciencia del Suelo y su Manejo.

Interferencias: En suelos contaminados con hidrocarburos, la materia orgánica (que incluye a los hidrocarburos), puede interferir con la determinación (Fernández *et al.* 2006).

Procedimiento

El método utilizado fue el más sencillo denominado cinta o prueba de tacto (Plastes, 2005). Se obtuvo una muestra (3-5g) de suelo suficiente para formar una pelota, se humedeció la muestra a nivel medio de humedad, con agua destilada dispensada de una pizeta. Se moldeó la muestra en una pelota, a continuación se apretó ligeramente para identificar la textura. Se formó una cinta entre el dedo índice y el pulgar observando si esta se puede hacer larga antes de romperse. Finalmente se reunió las observaciones obtenidas y se determinó la textura según los parámetros explicados por Plastes (2005) en su libro “La Ciencia del Suelo y su Manejo”. Pero en forma general se puede decir que la arena tiene un tacto arenisco, el limo suave y la arcilla pegajoso tacto (Plastes, 2005).

f) *Determinación de color*

Este parámetro se determinó con la finalidad de utilizarlo como una guía y confirmación de la irrigación y del contenido de Hidrocarburos.

Se determinó por comparación de una muestra de 2g en las tablas de colores de Munsell, definiendo aquí el matiz, brillo y saturación (Llora, 2004). Para una mejor comprensión se definen a continuación estos términos según Llora (2004):

Matiz: está determinado por la longitud de onda dominante de la luz visible reflejada; los colores negro, blanco y gris se denominan acromáticos porque no tienen matiz.

Brillo: es una medida de la intensidad del color por unidad de superficie; y es igual a la raíz cuadrada de del porcentaje de la luz visible que ha sido reflejada; cualitativamente indica si un cuerpo tiene color claro u oscuro.

Saturación: pureza relativa del color espectral dominante; cualitativamente indica si un color es vivo o apagado. Los colores acromáticos ya mencionas no tienen saturación.

En las tablas de Munsell los colores se agrupan por matices, por lo que los colores que aparecen en una misma hoja tienen el mismo matiz; el color del suelo determinado se representa de la siguiente manera (Llorca, 2004):

Matiz brillo /saturación

La determinación de los siguientes parámetros se realizó en el Laboratorio de suelos de AGROCALIDAD como servicios contratados, motivo por el cual, de los métodos utilizados para su determinación, solo se menciona su fundamento.

g) *Determinación de Nitrógeno*

Se realizó según el método de Kjeldahl (Kjeldahl J. 1883), el cual se basa en la digestión de la muestra en ácido sulfúrico concentrado a ebullición, con la adición de un catalizador. La muestra se digiere hasta disolución y oxidación de la misma. El nitrógeno contenido en la muestra se convierte en Amonio Sulfato. Añadiendo un exceso de solución de sodio hidróxido, el ion amonio es liberado en forma de amoniaco, destilado y recogido sobre una solución de ácido bórico o sobre una solución valorada de ácido sulfúrico. El amoniaco recogido es determinado con una solución valorada de ácido o se valora por retroceso con solución de sodio

hidróxido de concentración conocida, si se recogió sobre ácido sulfúrico. Los resultados se pueden expresar en % N. (Panreac Química S.L.U.).

h) *Determinación de Fósforo asimilable*

Fue determinado por el método Olsen, en el cual se forma un precipitado de color amarillo, que se origina cuando una muestra de suelo que contiene fósforo es tratada con molibdato de amonio, el precipitado es reducido con ácido ascórbico a azul molibdofosfórico; la concentración de fósforo se determina colorimétricamente, es decir, midiendo la intensidad de color de la sustancia, de modo que esa intensidad de color estará relacionada con la cantidad de sustancia (cuanto más intenso más fósforo). La intensidad de color se mide mediante la absorbancia en el espectrofotómetro (Marquez, s.f.).

i) *Determinación de Potasio*

Se determinó por el método fotométrico de llama, en el cual la muestra es atomizada, los átomos de potasio son excitados en la flama a un nivel de energía mayor, al regresar a su estado fundamental emiten energía en forma de luz de una longitud de onda de 768 nm que es específica para el análisis de este elemento. La luz pasa a través de un filtro o un monocromador, que selecciona la longitud de onda de la luz emitida por los átomos del potasio. La luz pasa a un detector de tipo fototubo integrado al sistema de lectura que puede ser digital o analógico. La intensidad de la luz emitida y la respuesta eléctrica del detector, son directamente proporcionales a la concentración del potasio (American Society for testing and Materials, 1994).

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS OBTENIDOS EN EL LABORATORIO Y EN CAMPO.

Para los datos obtenidos en campo en el monitoreo de individuos vegetales se aplicó la Prueba No Paramétrica de Kolmogorov-Smirnov del Software (Siegel, 1978), para evaluar los cambios de la altura de las plantas y número de hojas a lo largo del lapso de monitoreo; y, para comparar los datos de concentración de TPHs en los diferentes suelos después del experimento se aplicó el Análisis de Varianza no Paramétrico de

Kruskal-Wallis (Siegel, 1978) a las variables edáficas en suelos contaminados a 3 y 6% con petróleo, con y sin individuos vegetales, y en presencia y ausencia de fertilizante. La hipótesis se aceptó o negó cuando P era menor o igual a 0.05.

A los datos obtenidos de los demás análisis edáficos: Humedad, pH, M.O., Textura, Color, Nitrógeno, Fósforo y Potasio; no se les aplicó ninguna prueba estadística pues como se puede observar en el Anexo 14, dichos datos son en su mayoría similares entre tratamientos e incluso de entre los resultados al inicio del tratamiento y al final.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. *Determinación y obtención de individuos potencialmente bio-remediadores*

En el Cuadro 11 se presentan las características de las zonas de trabajo, algunas especies vegetales locales y las especies de las cuales se tomaron individuos para el protocolo de investigación.

Los individuos con potencial de fitorremediación provinieron de zonas con derrames de hasta 4 años de antigüedad (sector de Cuyuja-Baeza: 1 derrame; y, sector de Piedra Fina-El Chaco: 2 derrames). No se consideró el derrame de Papallacta por ser muy antiguo.

De las especies vegetales observadas, se seleccionaron a las que presentaron mayor abundancia de individuos en las zonas de los derrames: *Ludwigia peruviana*, *Mimosa polydactyla*, *Tessaria integrifolia* y *Verbena litoralis*, ya que se sospechó tenían mejores aptitudes como fitorremediadoras: un nivel apreciable de tolerancia (robustez y vigorosidad aparente) y mayor producción de biomasa (mayor tamaño) (según la bibliografía investigada US EPA (2000) y el ITRC (2001)).

Cuadro 11. Sitios de trabajo inicial y especies vegetales potencialmente bio-remediadoras

Lugares identificados con derrames (ocurridos entre 2006-2010)	Coordenadas Geográficas UTM y altitud (msnm)	Año del último derrame de petróleo	Observaciones	Especies localizadas con mayor abundancia	Nombre común	Plantas seleccionadas para el experimento
Papallacta	17M 0812828, 9'959649; 3644 msnm.	2001	fuera del límite temporal recomendado	no aplica	no aplica	NO
Baeza	17M 0833678, 9'952985; 2292 msnm.	2009	Ecosistema en proceso de recuperación, apoyado por remediación de empresas locales	<i>Desmodium intortum</i>	Amor seco	NO
				<i>Mimosa polydactyla</i>	Dormidera	SI
				<i>Pennisetum cf. clandestinum</i>	Césped kikuyo	NO
				<i>Tessaria integrifolia</i>	Árbol de Olivo	NO
				<i>Pennisetum purpureum</i>	Pasto Elefante	NO
				<i>Verbena litoralis</i>	Verbena	SI
El Chaco: zona con petróleo estancado.	18M 0203610, 9'982261; 1285msnm.	2009-2010	Estabilizado y controlado con geomembrana, pero a la intemperie	<i>Calopogonium mucunoides</i>	Calopo	NO
				<i>Mimosa polydactyla</i>	Dormidera	SI
				<i>Ludwigia peruviana</i>	Escobilla, Rosa de agua	SI
				<i>Pennisetum purpureum</i>	Pasto Elefante	NO
				<i>Tessaria integrifolia</i>	Árboles y plántulas de Olivo	SI
				<i>Verbena litoralis</i>	Verbena	SI
El Chaco: Sector Piedra Fina	18M 0207384, 9'984542; 1225 msnm.	2008	En proceso de remediación por parte de Petroecuador	<i>Desmodium intortum</i>	Amor seco	NO
				<i>Mimosa polydactyla</i>	Dormidera	SI
				<i>Ludwigia peruviana</i>	Escobilla o Rosa de agua	SI
				<i>Tessaria integrifolia</i>	Plántulas de olivo	SI
				<i>Verbena litoralis</i>	Verbena	SI
				<i>Pennisetum purpureum</i>	Pasto Elefante	NO

4.2. Instalación del Sitio de trabajo

- *Lugar*: Comunidad San Luis, Sector Piedra Fina, Cantón El Chaco, Provincia de Napo.
- *Sustrato*: 416 kg de suelo local.
- *Contaminante utilizado*: 12,96 kg de petróleo.
- *Bolsas preparadas con sustrato contaminado y no contaminado*: 72 bolsitas con sustrato correspondientes a 24 tratamientos (según el diseño experimental aplicado).

Luego, al trasplantar los individuos de las cuatro especies, se observaron los cambios ocurridos en ellos, tanto en sustratos sin contaminación y con contaminación, para discriminar si había efectos producidos por el stress del trasplante o por efecto del petróleo en el sustrato (Cuadro 12).

Cuadro 12. Reporte de adaptabilidad al trasplante de los individuos vegetales en los tratamientos establecidos en el diseño experimental.

Especies Recolectadas	N° Plantas	Supervivencia de los individuos trasplantados (a)
<i>Ludwigia peruviana</i>	24	90%
<i>Mimosa polydactyla</i>	24	80%
<i>Tessaria integrifolia</i>	24	80%
<i>Verbena litoralis</i>	24	75%

(a) Proceso mediante el cual las plantas se acomodaron exitosamente y en forma relativamente rápida a las nuevas condiciones dadas.

A pesar de que el nivel de adaptación de las plantas fue ligeramente diferente entre ellas, al final del primer mes de trasplantadas, ningún individuo en ninguna especie murió. Al inicio se observó un ligero marchitamiento temporal sobre todo en *Verbena litoralis* y *Mimosa polydactyla*. En cambio, *Ludwigia peruviana* resaltó por su capacidad pronta de adaptación, posiblemente por su condición de planta oportunista (Strathfield Council, 2010).

El riego se realizó con intervalos de cuatro días al inicio de la investigación; y al notar síntomas por falta de agua (pérdida ligera de la turgencia de las hojas de algunas

plantas, sobre todo en *Verbena litoralis*), el riego se realizó cada dos días (imitando lo que en la realidad sucede en este tipo de ambientes amazónicos).

4.3. Dinámica de Fitorremediación

A lo largo del presente trabajo como ya se explicó en el Capítulo 3, se llevó un registro de monitoreo y control del crecimiento (altura) y desarrollo (biomasa aérea) de los individuos vegetales potenciales bio-remediadores, los resultados (datos numéricos) de este proceso se exponen en el Anexo 13, el mismo se utilizó para la aplicación de las Pruebas estadísticas determinadas, cuyos resultados se exponen para cada especie más adelante.

En lo referente a los análisis de determinación de características físico-químicas del suelo al inicio y al final de la investigación en el Cuadro 13 se presentan los resultados de los análisis iniciales; y en el Anexo 14 debido a su extenso tamaño, se exponen los resultados de los análisis aplicados a los 5 meses de efectuados los tratamientos definidos en el diseño experimental.

Cuadro 13. Resultados de los análisis en el suelo utilizado (a)

Suelo sin Contaminación (al inicio del experimento)	
Parámetro	Resultado
pH	6.02
% Humedad	18.80
% Materia Orgánica	3.26
% Nitrógeno	0.16
Fósforo (ppm)	1.00
Potasio (cmol/kg)	0.25
g TPH en 4kg Suelo Seco	0.0001

(a) Una sola muestra compuesta de aprox. 500 mg procedentes de la zona del sitio de trabajo.

cmol= centimoles;

TPH= Hidrocarburos Totales de Petróleo.

A continuación se presentan, interpretan y discuten los resultados de la presente investigación, para cada especie estudiada:

Ludwigia peruviana

Se detectaron crecimientos (altura, cm) similares de las plantas en casi todos los tratamientos (Prueba de Kolmogorov-Smirnov) (Cuadro 14), lo cual quiere decir que no existió efecto alguno por parte del petróleo ni del fertilizante sobre las plantas; estos resultados coinciden con trabajos como el de Pérez *et al.* (2006), quienes determinan que existen plantas como la de tabaco que puede desarrollarse en suelos contaminados, y no mostrar síntomas visibles de afectación a su crecimiento en altura.

Cuadro 14. Resultados del Análisis de Kolmogorov-Smirnov para la comparación entre los vectores de crecimiento (altura de la planta, cm) de *Ludwigia peruviana* en los diferentes tratamientos.

Vectores de crecimiento	<i>Ludwigia</i> sin cont.	<i>Ludwigia</i> 3% cont.	<i>Ludwigia</i> 6% cont.	<i>Ludwigia</i> sin cont. Fert.	<i>Ludwigia</i> 3% cont. Fert.	<i>Ludwigia</i> 6% cont. Fert.
<i>Ludwigia</i> sin cont.	---					
<i>Ludwigia</i> 3% cont.	NS	---				
<i>Ludwigia</i> 6% cont.	NS	NS	---			
<i>Ludwigia</i> sin cont. y Fert.	NS	NS	NS	---		
<i>Ludwigia</i> 3% cont. Fert.	NS	NS	NS	S (crece mejor la planta sin cont. Fert.)	---	
<i>Ludwigia</i> 6% cont. Fert.	NS	NS	NS	NS	NS	---

NS= No existen diferencias significativas entre los vectores comparados ($p > 0.05$).

S= Si existe diferencias significativas entre los dos vectores ($p < 0.05$).

$\alpha = 0.05$

Nota: los datos utilizados para la aplicación de las pruebas estadísticas se presentan en el Anexo 13.

En el desarrollo de biomasa aérea (No. de hojas) hubo diferencias significativas entre casi todas las comparaciones efectuadas (Cuadro 15). La biomasa aérea fue mayor en los tratamientos sin contaminante con o sin fertilizante; un ejemplo fue los resultados de la comparación entre los tratamientos de 3% de HC frente a 3% de HC fertilizado, en el cual las plantas con mejor desarrollo foliar fueron las del tratamiento fertilizado. Un caso interesante fue la comparación de los tratamientos de 3% de HC frente al de

6% de HC fertilizado, este último tuvo mejor desarrollo, lo cual significa que la fertilización en el suelo tuvo una buena influencia sobre las plantas, ya que pudiera haber disminuido el efecto supresor del HC, permitiendo el aumento de la producción de biomasa aérea. Lo que permite inferir que una misma especie puede tolerar diferentes niveles de HC según tenga o no una adecuada disponibilidad de nutrientes (Luque, 2009).

Cuadro 15. Resultados del Análisis de Kolmogorov-Smirnov para la comparación entre los vectores de desarrollo de la biomasa aérea (No. de hojas) de *Ludwigia peruviana* en los diferentes tratamientos.

Vectores de desarrollo	<i>Ludwigia</i> sin cont.	<i>Ludwigia</i> 3% cont.	<i>Ludwigia</i> 6% cont.	<i>Ludwigia</i> sin cont. Fert.	<i>Ludwigia</i> 3% cont. Fert.	<i>Ludwigia</i> 6% cont. Fert.
<i>Ludwigia</i> sin cont.	---					
<i>Ludwigia</i> 3% cont.	S (<i>Ludwigia</i> sin cont.)*	---				
<i>Ludwigia</i> 6% cont.	S (<i>Ludwigia</i> sin cont.)	S (<i>Ludwigia</i> 3% cont.)	---			
<i>Ludwigia</i> sin cont. Fert.	S (<i>Ludwigia</i> sin cont. Fert.)	S (<i>Ludwigia</i> sin cont. Fert.)	S (<i>Ludwigia</i> sin cont. Fert.)	---		
<i>Ludwigia</i> 3% cont. Fert.	NS	S (<i>Ludwigia</i> 3% cont. Fert.)	S (<i>Ludwigia</i> 3% cont. Fert.)	S (<i>Ludwigia</i> sin cont. Fert.)	---	
<i>Ludwigia</i> 6% cont. Fert.	S (<i>Ludwigia</i> sin cont.)	S (<i>Ludwigia</i> 6% cont. Fert.)	S (<i>Ludwigia</i> 6% cont. Fert.)	S (<i>Ludwigia</i> sin cont. Fert.)	S (<i>Ludwigia</i> 3% cont. Fert.)	---

NS= No existen diferencias significativas entre los vectores comparados ($p > 0.05$).

S= Si existe diferencias significativas entre los dos vectores ($p < 0.05$).

$\alpha = 0.05$

* Los tratamientos mencionados entre paréntesis en las celdas, indican a las plantas que tuvieron mejor desarrollo foliar en la comparación.

Por otra parte, al observar la comparación de 3% de HC frente al de 6% de HC en ausencia de fertilizante las plantas con mejor desarrollo foliar fueron las de 3%, sugiriendo un mayor efecto supresor de desarrollo foliar ejercido por una mayor concentración de petróleo en el suelo.

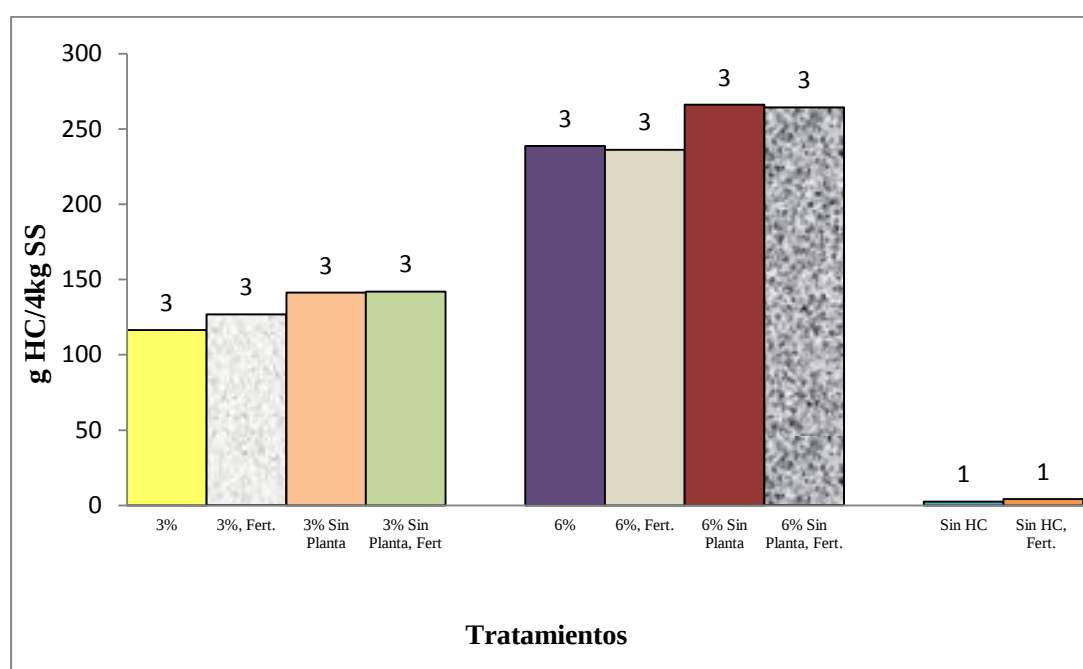
Entre los signos y síntomas relevantes luego de dos semanas del trasplante, tanto en plantas en sustratos con HC y sin HC, se registraron algunas hojas con amarillamiento (clorosis), en algunas enrollamiento foliar, puntas quemadas y algunas hojas y varias

ramas secas. Síntomas causados primariamente por el efecto del trasplante y secundariamente por la contaminación según lo propuesto por Fojta *et al.* (2006) y Evangelou *et al.* (2006) (citados por Pérez *et al.* 2006). Cabe mencionar, que pese a estos signos y síntomas ningún individuo murió, siendo ésta la especie que sobresalió de las demás, pues siempre mantuvo hojas verdes con retoños continuos; mostrando mayor tolerancia visible a la contaminación.

No hubo diferencia a nivel radicular entre los tratamientos.

En cuanto al análisis del contenido de Hidrocarburos totales de petróleo (TPHs) los resultados obtenidos en las dos pruebas de Kruskal-Wallis (una entre los tratamientos al 3% de petróleo y otra entre los de 6%) (Figura 5) denotaron que en ningún tratamiento hubo actividad fitorremediadora (absorción efectiva de HC).

Figura 5. Medianas de concentración de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) al final del experimento en suelos contaminados y no contaminados, tratados con *Ludwigia peruviana*.



3%, 6%= suelo contaminado al 3% y 6% con Hidrocarburos de petróleo, respectivamente.

3% Fert., 6% Fert.= suelo contaminado al 3% y 6% con Hidrocarburos de petróleo, respectivamente y además fertilizados.

Sin HC= suelo sin contaminación de Hidrocarburos de petróleo.

Sin HC, Fert.= ídem, pero fertilizado.

El tamaño de la muestra se observa sobre cada columna.

Se puede concluir finalmente, que la presencia de fertilizante tuvo un efecto notorio en el desarrollo de biomasa aérea (No. de hojas) de las plantas, pero no fue así en su crecimiento (altura de las plantas) y la degradación de Hidrocarburos de petróleo.

Con respecto a los resultados de determinación de una latente aunque débil actividad fitorremediadora pudiera ser necesario un mayor tiempo de observación de los tratamientos, pues como lo explica López (2008) una desventaja de la fitorremediación suele ser los largos períodos de tiempo para obtener resultados significativos.

Mimosa polydactyla

Sus individuos tuvieron crecimientos (altura, cm) similares en todos los tratamientos, tanto en suelos contaminados como en suelos no contaminados, sin diferencias significativas; al igual que en *L. peruviana* esta planta demostró que también puede crecer en un suelo contaminado por petróleo y no mostrar síntomas visibles de afectación, lo cual indicaría una medida de la tolerancia de esta especie a tal condición.

En cuanto al desarrollo de su biomasa aérea (No. de hojas) presentó diferencias en casi todas las comparaciones efectuadas en los tratamientos (Cuadro 16), destacándose con un mejor crecimiento los tratamientos: (1) con menor concentración de HC frente a los de mayor concentración y (2) los sin contaminación de HC frente a los contaminados. Por otro lado, en el caso del tratamiento sin contaminación frente al tratamiento sin contaminación pero fertilizado, se desarrollaron mejor las plantas sin fertilización; lo que estaría demostrando que el fertilizante utilizado no tuvo influencia sobre el desarrollo foliar (biomasa aérea o No. de hojas) de las plantas, quizá debido a una reacción metabólica de esta especie, pues como lo explica González (2007) la intensidad de la captura de nutrientes va a depender de las necesidades de la planta (hambre metabólica) que se condiciona mediante la regulación bioquímica de los sistemas de captura, transferencia y asimilación de nutrientes en cada momento fisiológico de la misma.

Cuadro 16. Resultados del Análisis de Kolmogorov-Smirnov para la comparación entre los vectores de desarrollo de la biomasa aérea (No. de hojas) de *Mimosa polydactyla* en los diferentes tratamientos.

Vectores de desarrollo	<i>Mimosa</i> sin cont.	<i>Mimosa</i> 3% cont.	<i>Mimosa</i> 6% cont.	<i>Mimosa</i> sin cont. Fert.	<i>Mimosa</i> 3% cont. Fert.	<i>Mimosa</i> 6% cont. Fert.
<i>Mimosa</i> sin cont.	---					
<i>Mimosa</i> 3% cont.	S (<i>Mimosa</i> sin cont.)*	---				
<i>Mimosa</i> 6% cont.	S (<i>Mimosa</i> sin cont.)	S (<i>Mimosa</i> 3% cont.)	---			
<i>Mimosa</i> sin cont. Fert.	S (<i>Mimosa</i> sin cont.)	S (<i>Mimosa</i> sin cont. Fert.)	S (<i>Mimosa</i> sin cont. Fert.)	---		
<i>Mimosa</i> 3% cont. Fert.	NS	S (<i>Mimosa</i> 3% cont. Fert.)	S (<i>Mimosa</i> 3% cont. Fert.)	S (<i>Mimosa</i> sin cont. Fert.)	---	
<i>Mimosa</i> 6% cont. Fert.	S (<i>Mimosa</i> sin cont.)	S (<i>Mimosa</i> 3% cont.)	S (<i>Mimosa</i> 6% cont.)	S (<i>Mimosa</i> sin cont. Fert.)	S (<i>Mimosa</i> 3% cont. Fert.)	---

NS= No existen diferencias significativas entre los vectores comparados ($p > 0.05$).

S= Si existe diferencias significativas entre los dos vectores ($p < 0.05$).

$\alpha = 0.05$

* Los tratamientos mencionados entre paréntesis en las celdas, indican a las plantas que tuvieron mejor desarrollo foliar en la comparación.

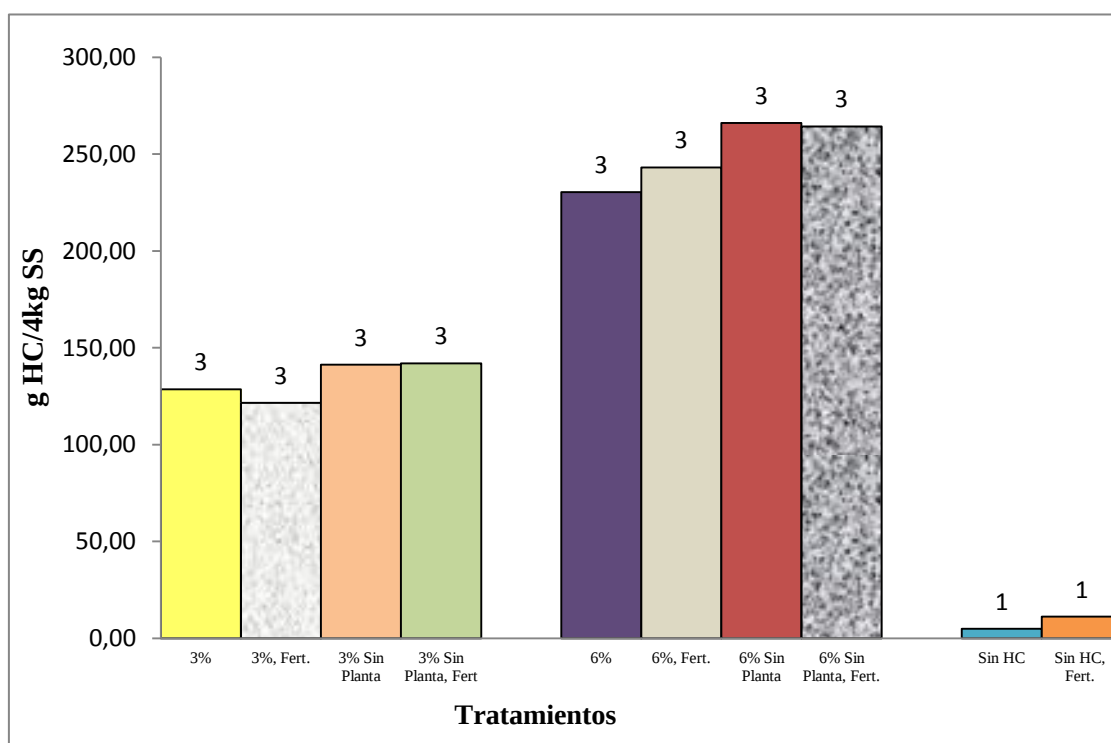
Los datos utilizados para la aplicación de las pruebas estadísticas se presentan en el Anexo 13.

Los signos y síntomas negativos que presentaron las plantas en todos los tratamientos (ligeramente acentuados en los tratamientos contaminados con petróleo) fueron: hojas con ligero amarillamiento, muchas secas y varias cayeron; varias ramas secas, 10 plantas murieron de las cuales 7 tenían contaminante y fertilizante y 1 en sustrato sin contaminante. Este efecto corrobora lo explicado anteriormente, evento también sugerido por González (2007), respecto al fertilizante en las plantas, pues expone que las cantidades en exceso (para esta especie por su particular metabolismo) de un nutriente puede convertir tal “exceso” en un tóxico, sumado a ello el efecto del contaminante habría actuado sinérgicamente llevando a las plantas a un prematuro deceso.

No hubo diferencias visibles a nivel radicular entre los tratamientos.

Las dos pruebas de Kruskal-Wallis corridas (entre los tratamientos sometidos al 3 % de contaminación y entre los tratamientos de 6%) permiten inferir que estas plantas no mostraron actividad fitorremediadora (Figura 6).

Figura 6. Medianas de concentración de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) al final del experimento en suelos contaminados y no contaminados, tratados con *Mimosa polydactyla*.



3%, 6%= suelo contaminado al 3% y 6% con petróleo, respectivamente.
 3% Fert., 6% Fert.= suelo contaminado al 3% y 6% con petróleo, respectivamente y fertilizados.
 Sin HC= suelo sin contaminación de Hidrocarburos de petróleo.
 Sin HC, Fert.=  dem, pero fertilizado.
 El tamaño de la muestra sobre cada columna.

Se debe, por tanto, mencionar que el fertilizante no tuvo un efecto importante para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Esta especie mostró poca tolerancia al contaminante (evidenciada en las plantas que murieron), ya otros investigadores como Luque (2009) enuncian que el petróleo suele ser en algunas especies el responsable de este suceso. Por tanto esta especie queda descartada para posibles futuras investigaciones de fitorremediación, pues no cumple con lo sugerido por estudiosos del tema tal como Salt *et al.* (1998), USEPA, (2000), Harvey *et al.* (2001), y Davis *et al.* (2002) (citados por Peña *et al.* 2006), quienes enuncian como condición primordial para el éxito de una especie fitorremediadora que tal especie debe ser tolerante y poder

desarrollarse en un ambiente contaminado con TPH. El resultado obtenido para la presente especie es similar a lo obtenido por otros investigadores como en el estudio realizado por Rivera *et al.* (2005) con leguminosas, las plantas de las especies de dormilona (*Mimosa* sp.) y zarza (*Mimosa pigra*) no lograron sobrevivir al efecto de la concentración experimental de petróleo (150000 mg·kg⁻¹ HTP).

Tessaria integrifolia

El crecimiento (altura, cm) de estas plantas fue en general similar en suelos contaminados y suelos no contaminados (Cuadro 17). Lo que permite inferir que al parecer el petróleo no participó o no inhibió algunas reacciones fisiológicas básicas (y tampoco provocó síntomas visibles de afectación) de los individuos (Pérez *et al.* 2006), puesto que no existen diferencias de altura de las plantas entre los tratamientos sin contaminación frente a los tratamientos con mayor concentración de petróleo (6%); ni entre las plantas de los tratamientos sin contaminación con y sin fertilizante.

Sin embargo, existieron como excepción 2 comparaciones entre tratamientos (Cuadro 17): (1) sin contaminación y sin fertilizante versus el de 3% de HC y fertilizado, y (2) sin contaminación y sin fertilizante versus el tratamiento con 6% de HC y fertilizado; en los cuales los tratamientos sin contaminación tuvieron un mejor crecimiento (altura), tales excepciones indicarían que posiblemente la acción del fertilizante fue aplacado por efecto del petróleo en el sustrato, como también lo menciona Luque (2009) quien afirma que la presencia de HC puede reducir significativamente el aprovechamiento de los nutrientes, afectando más mientras mayor contaminación se tenga.

Cuadro 17. Resultados del Análisis de Kolmogorov-Smirnov para la comparación entre los vectores de crecimiento (altura de las plantas, cm) de *Tessaria integrifolia* en los diferentes tratamientos.

Vectores de crecimiento	<i>Tessaria</i> sin cont.	<i>Tessaria</i> 3% cont.	<i>Tessaria</i> 6% cont.	<i>Tessaria</i> sin cont. Fert.	<i>Tessaria</i> 3% cont. Fert.	<i>Tessaria</i> 6% cont. Fert.
<i>Tessaria</i> sin cont.	---					
<i>Tessaria</i> 3% cont.	NS	---				
<i>Tessaria</i> 6% cont.	NS	NS	---			
<i>Tessaria</i> sin cont. Fert.	NS	NS	NS	---		
<i>Tessaria</i> 3% cont. Fert.	S (crece mejor la planta sin cont.)	NS	NS	NS	---	
<i>Tessaria</i> 6% cont. Fert.	S (crece mejor la planta sin cont.)	NS	NS	NS	NS	---

NS= No existen diferencias significativas entre los vectores comparados ($p > 0.05$).

S= Si existe diferencias significativas entre los dos vectores ($p < 0.05$).

$\alpha = 0.05$

Los datos utilizados para la aplicación de las pruebas estadísticas se presentan en el Anexo 13.

En cuanto a la biomasa aérea (No. de hojas), todos los tratamientos presentaron un desarrollo diferente (Cuadro 18), se observa que los tratamientos sin contaminación en presencia y ausencia de fertilizante tuvieron un mejor crecimiento que los tratamientos contaminados; por otra parte, en la comparación entre tratamientos contaminados tuvieron un mayor desarrollo aquellos en los que no se aplicó fertilizante, lo cual indicaría que de alguna manera el petróleo o algún factor desencadenado por su presencia pudiera estar contribuyendo en cierta manera al desarrollo de biomasa aérea, aunque éste no haya funcionado de manera sinérgica con el fertilizante aplicado, sino más bien sin él; esto pudiera explicarse debido a que algunas especies vegetales pueden tener respuestas complejas ante la presencia de un contaminante hidrófobo o hidrófilo y pueden responder de diversas maneras a sus efectos (Peña *et al.* 2006).

Cuadro 18. Resultados del Análisis de Kolmogorov-Smirnov para la comparación entre los vectores de desarrollo de la biomasa aérea (No. de hojas) de *Tessaria integrifolia* en los diferentes tratamientos.

Vectores de desarrollo	<i>Tessaria</i> sin cont.	<i>Tessaria</i> 3% cont.	<i>Tessaria</i> 6% cont.	<i>Tessaria</i> sin cont. Fert.	<i>Tessaria</i> 3% cont. Fert.	<i>Tessaria</i> 6% cont. Fert.
<i>Tessaria</i> sin cont.	---					
<i>Tessaria</i> 3% cont.	S (<i>Tessaria</i> sin cont.)*	---				
<i>Tessaria</i> 6% cont.	S (<i>Tessaria</i> sin cont.)	S (<i>Tessaria</i> 6% cont.)	---			
<i>Tessaria</i> sin cont. Fert.	S (<i>Tessaria</i> sin cont. Fertilizada)	S (<i>Tessaria</i> sin cont. Fert.)	S (<i>Tessaria</i> sin cont. Fert.)	---		
<i>Tessaria</i> 3% cont. Fert.	S (<i>Tessaria</i> sin cont.)	S (<i>Tessaria</i> 3% cont.)	S (<i>Tessaria</i> 6% cont.)	S (<i>Tessaria</i> sin cont. Fert.)	---	
<i>Tessaria</i> 6% cont. Fert.	S (<i>Tessaria</i> sin cont.)	S (<i>Tessaria</i> 3% cont.)	S (<i>Tessaria</i> 6% cont.)	S (<i>Tessaria</i> sin cont. Fert.)	S (<i>Tessaria</i> 6% cont. Fert.)	---

S= Si existe diferencias significativas entre los dos vectores ($p < 0.05$).

$\alpha = 0.05$

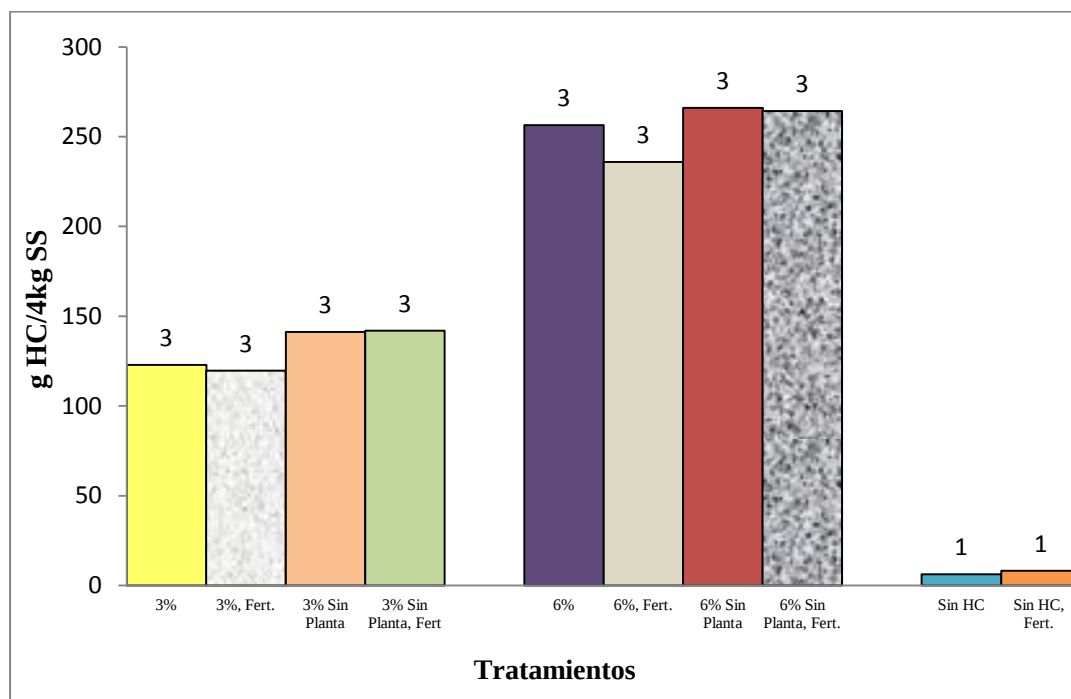
* Los tratamientos mencionados entre paréntesis en las celdas, indican a las plantas que tuvieron mejor desarrollo foliar en la comparación.

Los signos y síntomas que presentaron las plantas en todos los tratamientos (ligeramente acentuados en los tratamientos contaminados con petróleo) fueron: hojas con amarillamiento de ligero a severo, puntas quemadas, unas pocas secas, y otras pocas amorfas, en algunas hubo perforaciones causadas por insectos. Finalmente, 5 plantas murieron, 4 de ellas en condiciones de fertilización, aunque es importante aclarar que estos decesos fueron por causas accidentales en el sitio de trabajo (exceso de humedad por rotura del plástico del sitio de trabajo). Además, fue visible que las plantas en los tratamientos sin hidrocarburos tuvieron mejor desarrollo aparente que las que se encontraban en sustratos contaminados, un claro indicio de ello fue el color más verde y brillante y mejor tamaño de las hojas.

Las dos pruebas de Kruskal-Wallis (una entre los tratamientos al 3% y otra entre los de 6%; Figura 7; Cuadro 19) demostraron actividad fitorremediadora en esta especie a bajas concentraciones de petróleo (3%) y con aplicación de fertilizante (Figura 7); con

una tasa de degradación establecida entre un rango de 14.4% – 21.3% (Figura 8), para el tratamiento determinado como fitorremediador.

Figura 7. Medianas de concentración de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) al final del experimento en suelos contaminados y no contaminados, tratados con *Tessaria integrifolia*.



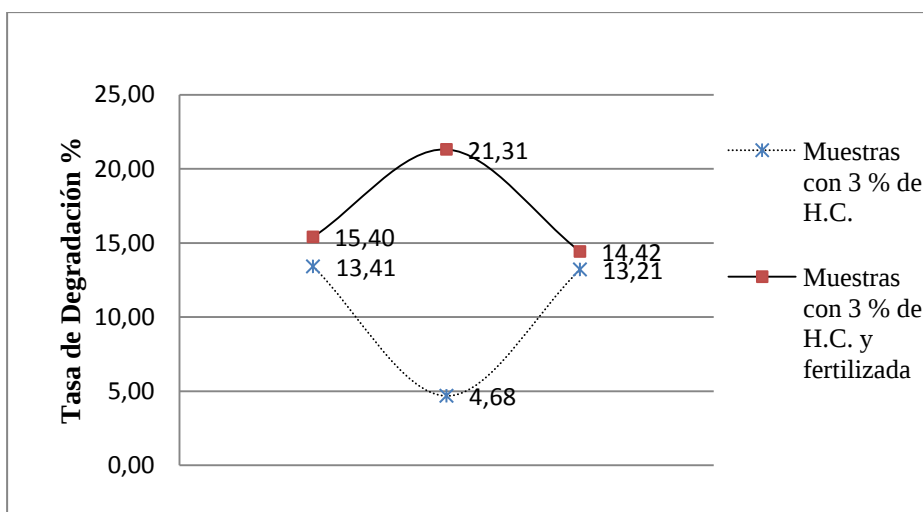
3%, 6%= suelo contaminado al 3% y 6% con petróleo, respectivamente.
 3% Fert., 6% Fert.= suelo contaminado al 3% y 6% con petróleo, respectivamente y fertilizados.
 Sin HC= suelo sin contaminación de Hidrocarburos de petróleo.
 Sin HC, Fert.= ídem, pero fertilizado.
 El tamaño de la muestra sobre cada columna.

Cuadro 19. Resultados de la Prueba de Kruskal-Wallis en la comparación de los valores de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) en suelo tratado con *Tessaria integrifolia*.

Tessaria integrifolia con contaminación al 3%							
	Tratamientos			H	p	Hipótesis	Conclusiones
N° de Mues- tra	Sin planta	Con planta, sin medio Fertili- zado	Con planta, con medio Fertili- zado				
		Cantidad de TPH (g TPHs /4kg suelo)					
1	148.3	122.5	119.7	6.49	0.039	Existe al menos un tratamiento que muestra diferencias significativas en la cantidad de TPHs.	La cantidad de TPHs en el grupo de Plantas con medio Fertilizado fue significativamente menor al grupo de tratamientos Sin Planta.
2	134.2	134.9	111.3				La cantidad de TPHs en el grupo de Plantas sin Fertilizante no fue diferente al tratamiento Sin Planta.
3	141.9	122.8	121.1				
Tessaria integrifolia con contaminación al 6%							
1	264.3	256.4	230.9	3.23	0.20	No existe diferencia entre tratamientos	-
2	267.9	272.2	240.9				-
3	264.3	213.3	236.0				-

H= valor estadístico de la prueba de Kruskal-Wallis;
p= valor de probabilidad de tener un error en la prueba.

Figura 8. Tasas de degradación (%) de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) al final del experimento en suelos contaminados con y sin fertilizante de los tratamientos identificados con potencial de fitorremediación, tratados con *Tessaria integrifolia*



H.C.= Hidrocarburos de petróleo

Por tanto, cabe mencionar que el fertilizante no tuvo un aporte importante para el crecimiento en altura, ni para el desarrollo foliar de las plantas, pudiendo haber actuado de manera neutra y/o entorpecida por el petróleo, debido a lo propuesto por Luque (2009) quien menciona que los HC pueden reducir significativamente el aprovechamiento de los nutrientes (el fertilizante). Sin embargo, esto no sucede en cuanto a la degradación de HC, puesto que en cuanto a este parámetro, según los resultados de las pruebas aplicadas, el fertilizante fue útil en la captura y degradación de HC por parte de las plantas, en especial cuando el contaminante se encontraba en menores concentraciones. En estudios como el de Olguín *et al.* (2007) se explica que la razón de las diferentes respuestas de las especies a los hidrocarburos no es clara y pudiera deberse a diversos factores tales como a diferentes rutas bioquímicas de degradación de los hidrocarburos, así como diferencias en la tolerancia a condiciones anaeróbicas de las raíces cubiertas por las capas grasosas del petróleo; también menciona que la especie que más altas concentraciones de hidrocarburos acumuló, consecuentemente tuvo una inhibición mayor del crecimiento en relación a otras especies. De esta manera, resulta necesario, en lo que se refiere a esta especie, ampliar el tiempo de tratamiento para confirmar si *Tessaria integrifolia* es fitorremediadora a mayores concentraciones que 3%, tal vez esta especie por encontrarse bien adaptada a zonas húmedas y a suelos arenosos de orillas de ríos locales, podría desempeñarse de una manera adecuada como planta útil para efectuar procesos de rizofiltración de acuerdo al esquema propuesto por López *et al.* (2005).

Verbena litoralis

Con respecto al crecimiento (altura de las plantas), ésta es la especie que más diferencias significativas tuvo, la característica más notoria fue en las comparaciones de los tratamientos: (1) sin contaminación fertilizado frente a sin contaminación sin fertilizante y (2) sin contaminación fertilizado frente a tratamientos contaminados con y sin fertilizante (Cuadro 20): los tratamientos sin contaminación y fertilizados crecieron mejor. Revelando que la fertilización fue una condición que mejoró en esta especie el crecimiento en altura de las plantas cuando éstas no tuvieron contaminante.

Cuadro 20. Resultados del Análisis de Kolmogorov-Smirnov para la comparación entre los vectores de crecimiento (altura de las plantas, cm) de *Verbena litoralis* en los diferentes tratamientos.

Vectores de crecimiento	<i>Verbena</i> sin cont.	<i>Verbena</i> 3% cont.	<i>Verbena</i> 6% cont.	<i>Verbena</i> sin cont. Fert.	<i>Verbena</i> 3% cont. Fert.	<i>Verbena</i> 6% cont. Fert.
<i>Verbena</i> sin cont.	---					
<i>Verbena</i> 3% cont.	NS	---				
<i>Verbena</i> 6% cont.	NS	NS	---			
<i>Verbena</i> sin cont. Fert.	S (<i>Verbena</i> sin cont. Fert.)	S (<i>Verbena</i> sin cont. Fert.)	S (<i>Verbena</i> sin cont. Fert.)	---		
<i>Verbena</i> 3% cont. Fert.	NS	NS	NS	S (<i>Verbena</i> sin cont. Fert.)	---	
<i>Verbena</i> 6% cont. Fert.	NS	NS	NS	S (<i>Verbena</i> sin cont. Fert.)	NS	---

NS= No existen diferencias significativas entre los vectores comparados ($p > 0.05$).

S= Si existe diferencias significativas entre los dos vectores ($p < 0.05$).

$\alpha = 0.05$

* Los tratamientos mencionados entre paréntesis en las celdas, indican a las plantas que tuvieron mejor crecimiento (altura) en la comparación.

Los datos utilizados para la aplicación de las pruebas estadísticas se presentan en el Anexo 13.

En cuanto a la evolución de biomasa aérea (No. de hojas) se observa que los tratamientos (Cuadro 21) sin contaminación tuvieron un mejor desarrollo foliar frente a los tratamientos con contaminación. El contaminante en esta especie aparentemente está suprimiendo el desarrollo foliar e inhibe la acción del fertilizante aplicado, no produjo un desarrollo significativo mayor de la biomasa aérea.

En lo referente a signos y síntomas generales, la mayoría de los individuos en todos los tratamientos presentaron hojas con amarillamiento, perforaciones, puntas quemadas, varias se secaron, algunas se tornaron de color violáceo; en algunas plantas se secaron los tallos, aunque retoñaron nuevas ramitas y hojas, finalmente solo 2 plantas murieron (una con 3% de HC y otra con 6% de HC, las dos en medios sin fertilización).

Cuadro 21. Resultados del Análisis de Kolmogorov-Smirnov para la comparación entre los vectores de desarrollo de la biomasa aérea (No. de hojas) de *Verbena litoralis* en los diferentes tratamientos.

Vectores de crecimiento	<i>Verbena</i> sin cont.	<i>Verbena</i> 3% cont.	<i>Verbena</i> 6% cont.	<i>Verbena</i> sin cont. Fert.	<i>Verbena</i> 3% cont. Fert.	<i>Verbena</i> 6% cont. Fert.
<i>Verbena</i> sin cont.	---					
<i>Verbena</i> 3% cont.	S (<i>Verbena</i> sin cont.)	---				
<i>Verbena</i> 6% cont.	S (<i>Verbena</i> sin cont.)	S (<i>Verbena</i> 3% cont.)	---			
<i>Verbena</i> sin cont. Fert.	S (<i>Verbena</i> sin cont. Fertilizada)	S (<i>Verbena</i> sin cont. Fert.)	S (<i>Verbena</i> sin cont. Fert.)	---		
<i>Verbena</i> 3% cont. Fert.	S (<i>Verbena</i> sin cont.)	NS	NS	S (<i>Verbena</i> sin cont. Fert.)	---	
<i>Verbena</i> 6% cont. Fert.	S (<i>Verbena</i> sin cont.)	S (<i>Verbena</i> 3% cont.)	NS	S (<i>Verbena</i> sin cont. Fert.)	NS	---

NS= No existen diferencias significativas entre los vectores comparados ($p > 0.05$).

S= Si existe diferencias significativas entre los dos vectores ($p < 0.05$).

$\alpha = 0.05$

* Los tratamientos mencionados entre paréntesis en las celdas, indican a las plantas que tuvieron mejor desarrollo foliar en la comparación.

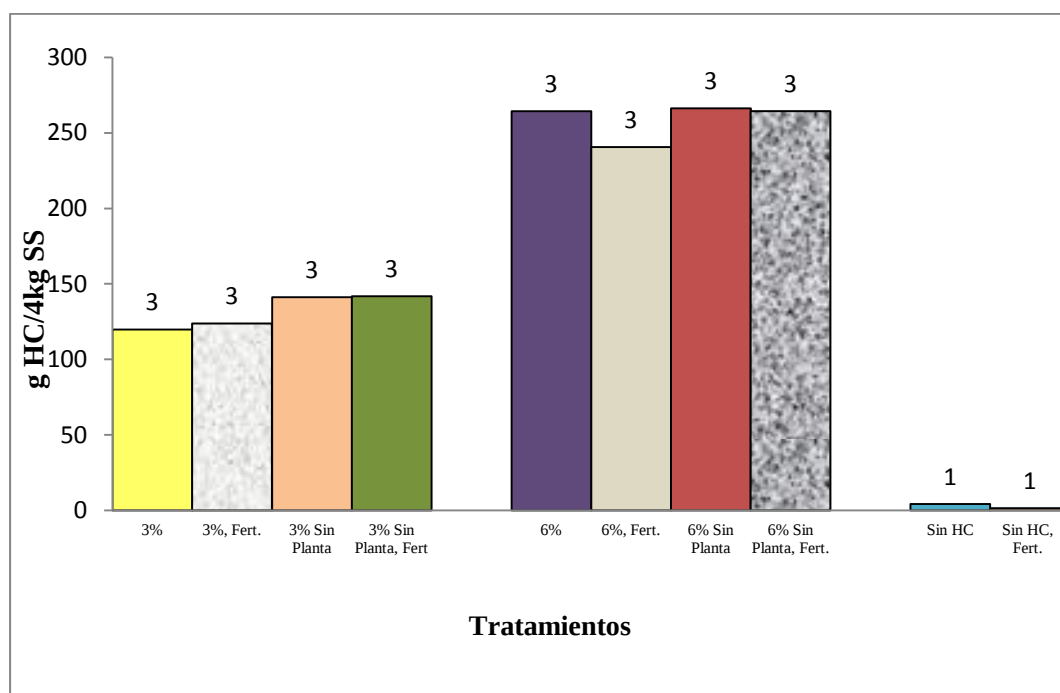
Esta especie aparentemente tuvo una menor tolerancia inicial a los contaminantes, pues la mayoría de sus hojas se secaban más rápidamente en suelos contaminados, aunque con el tiempo rebrotaron hojuelas; esto concuerda con lo reportado por Olguín *et al.* (2007), quienes encontraron comportamientos similares en plantas de manglares.

Mediante la aplicación de la Prueba de Kruskal-Wallis se pudo concluir que *Verbena litoralis* tiene una actividad fitorremediadora leve, a bajas concentraciones de petróleo (3%) en tratamientos no fertilizados (Figura 9; Cuadro 22)); con una tasa de degradación establecida entre un rango de 13.2% – 17.4% (Figura 10).

El fertilizante tuvo un aporte importante para el crecimiento en cuanto a altura de las plantas sin contaminación, aunque éste fue inhibido por los HC en los tratamientos

contaminados, al igual que el desarrollo foliar y la degradación de HC, puesto que como se puede observar (Cuadro 22; Figura 10), en tratamientos a bajas concentraciones y sin fertilizante, si hubo actividad fitorremediadora; siendo necesario para *V. littoralis* (al igual que en *T. integrifolia*) ampliar el tiempo de tratamiento para confirmar si la especie es buena fitorremediadora a mayores concentraciones.

Figura 9. Medianas de concentración de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) al final del experimento en suelos contaminados y no contaminados, tratados con *Verbena littoralis*.



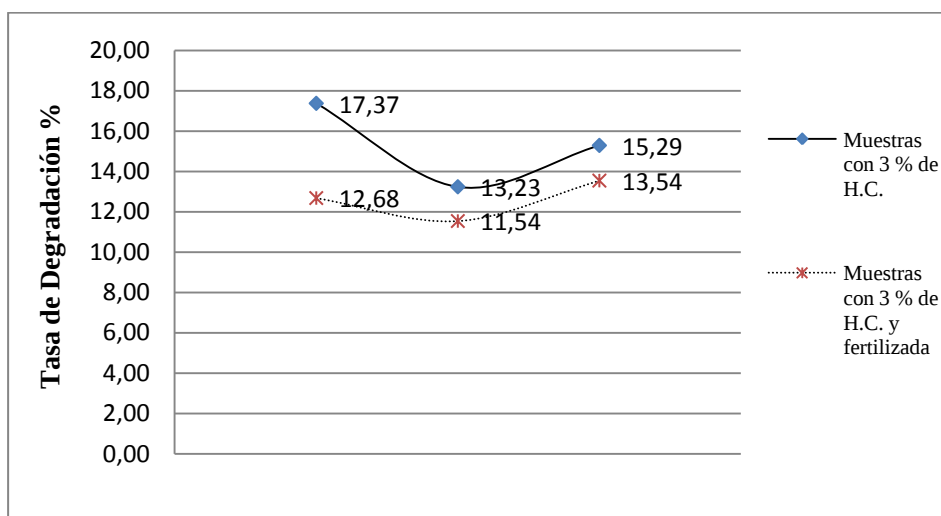
3%, 6%= suelo contaminado al 3% y 6% con petróleo, respectivamente.
 3% Fert., 6% Fert.= suelo contaminado al 3% y 6% con petróleo, respectivamente y fertilizados.
 Sin HC= suelo sin contaminación de Hidrocarburos de petróleo.
 Sin HC, Fert.= ídem, pero fertilizado.
 El tamaño de la muestra sobre cada columna.

Cuadro 22. Resultados de la Prueba de Kruskal-Wallis en la comparación de los valores de TPHs en suelo tratado con *Verbena litoralis*.

Verbena litoralis con contaminación al 3%							
	Tratamientos			H	P	Hipótesis	Conclusiones
N° de Mues- tra	Sin planta	Con planta, sin medio Fertili- zado	Con planta, con medio Fertili- zado				
	Cantidad de TPH (g TPHs /4kg suelo)						
1	148.3	116.9	125.2	6.489	0.039	Existe al menos un tratamiento que muestra diferencias significativas en la cantidad de TPHs.	La cantidad de TPHs en el grupo de Plantas sin medio Fertilizado fue significativamente menor al grupo de tratamientos Sin Planta.
2	134.3	122.8	122.3				La cantidad de TPHs en el grupo de Plantas con Fertilizante no fue diferente al tratamiento Sin Planta
3	141.9	119.9	123.5				
Verbena litoralis con contaminación al 6%							
1	264.3	258.3	234.2	4.66	0.097	No existe diferencia entre tratamientos	-
2	267.9	264.2	240.7				-
3	264.3	269.6	259.7				-

H= valor estadístico de la prueba de Kruskal-Wallis;
p= valor de probabilidad de tener un error en la prueba.

Figura 10. Tasas de degradación (%) de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) al final del experimento en suelos contaminados con y sin fertilizante de los tratamientos identificados con potencial de fitorremediación, tratados con *Verbena litoralis*



H.C.= Hidrocarburos de petróleo.

Finalmente, los valores de contaminación presentes luego de los tratamientos aplicados con las especies determinadas como fitorremediadoras (a bajas concentraciones) en esta investigación, al promediar las muestras de los tratamientos efectivos (Figuras 8 y 10) fueron:

- *Tessaria integrifolia*: 29,35 g/kg
- *Verbena litoralis*: 29,96 g/kg

Valores que no alcanzan los límites permisibles ($< 2,5\text{g/kg}$) de hidrocarburos en suelos determinados por el Ministerio de Energía y Minas (Cuadro 10, citado en el Capítulo 3), siendo éste otro indicio de ampliar en investigaciones futuras el tiempo de los tratamientos.

4.4. Consideraciones generales

En general en todos los tratamientos contaminados, al inicio del ensayo, las raíces de las plantas de todas las especies tuvieron contacto parcial con el sustrato con petróleo; cinco meses después, al finalizar el ensayo, se observó que las raíces de todas las plantas se habían desarrollado incluso hasta la base del sustrato; sin embargo, las raíces que se destacaron en su crecimiento fueron las de *Tessaria integrifolia* y *Verbena litoralis* (plantas que se determinaron con buenas características fitorremediadoras), aunque en su parte aérea tendieron a secarse algo más que en *Ludwigia peruviana* y *Mimosa polydactyla* (no fitorremediadoras), situación también reportada por investigadores como Olguín *et al.* (2007) quienes indican que las plantas fitorremediadoras al absorber los Hidrocarburos de petróleo gracias a un mejor desarrollo de sus raíces, evidencian un efecto opuesto del contaminante debido al deterioro de su parte aérea.

Mujica *et al.* (2006) mencionan que hay una tendencia general a disminuir los caracteres relacionados con el crecimiento en la medida que aumenta la concentración de petróleo; sin embargo, consideran posible mediante la utilización de ciertos cultivos la recuperación de suelos contaminados con bajos niveles de petróleo.

Con respecto a lo sucedido con las plantas de las 4 especies en la presente investigación, se puede mencionar que la contaminación por Hidrocarburos afectó el

desarrollo de las plantas debido a diferentes efectos físicos y bioquímicos; pues películas de aceite pueden haber cubierto las raíces modificando la absorción normal de agua y nutrientes; adicionalmente, si los Hidrocarburos logran penetrar el tejido de las plantas podrían dañar la membrana de las células causando pérdida de su contenido, bloqueo de los espacios intercelulares y reducción del transporte de metabolitos, así como de las tasas de respiración y fotosíntesis, según lo reportado por otros investigadores (Pezeshki, *et al.* 2000, citados por Mujica *et al.* 2006).

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El potencial de fitorremediación de las especies estudiadas se confirmó solo en dos de las cuatro analizadas (*Tessaria integrifolia* y *Verbena litoralis*), se recomienda en futuros estudios realizar este ensayo o uno similar con otras especies locales pero con más repeticiones por tratamiento.

Tessaria integrifolia, especie arbórea, mostró un potencial de fitorremediación dado en un rango entre 14.4% – 21.3% en tratamientos con adición de fertilizante en el suelo y a bajas concentraciones (3%) de petróleo. *Verbena litoralis*, especie herbácea, mostró un potencial de fitorremediación dado en un rango entre 13.2% – 17.4% en tratamientos sin adición de fertilizante en el suelo y a bajas concentraciones (3%) de petróleo. Estas dos especies degradaron el petróleo en forma significativa respecto a las demás especies ensayadas y a las demás condiciones dadas.

La determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) a través del método gravimétrico reflejó adecuadamente la degradación de los Hidrocarburos en el sustrato y en el desempeño de la fitorremediación. Se recomienda en futuros estudios realizar otras determinaciones que reflejen el comportamiento de los componentes hidrocarburiíferos durante el proceso degradativo, tales como la determinación de Hidrocarburos livianos (C6 a C40), fracciones determinadas por el método SARA, PAH's y la evolución cromatográfica de los n-alcanos a través del tiempo.

El comportamiento diferencial en los tratamientos fertilizados respecto a los no fertilizados, evidenciada levemente mayor biodegradación de los Hidrocarburos, justificando la necesidad de aportar nutrientes al medio durante el proceso de Fitorremediación solo en el caso de utilizar *Tessaria integrifolia* como especie fitorremediadora.

Se considera que el tratamiento realizado, resultó un enfoque adecuado para la descontaminación de los suelos con concentraciones bajas de hidrocarburos de petróleo, pero se requeriría necesariamente de un período mayor de aplicación del procedimiento, tal vez más de 1 año, para reducir la concentración de los

hidrocarburos a valores menores a los fijados por el Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador (Ministro de Energía y Minas, 2001).

En condiciones similares a los de este ensayo la implementación de la Fitorremediación se considera como una tecnología eficiente ya que a través del crecimiento de plantas *Tessaria integrifolia* y *Verbena litoralis* sobre suelos contaminados se permitiría la producción de una biomasa suficiente para la fitodegradación gradual en un período de tiempo más prolongado.

La respuesta mostrada por *T. integrifolia* y *V. litoralis*, las muestra como especies a ser tenidas en cuenta para restaurar ambientes contaminados con petróleo en zonas preferentemente amazónicas de Ecuador ubicados entre 0 a 3500msnm (alturas de supervivencia de las especies determinadas), abriéndose también la posibilidad de realizar ensayos de campo más minuciosos en sitios con derrames relativamente antiguos de petróleo; o a su vez que estas especies sean utilizadas como complementarias a las técnicas de remediación químicas y físicas tradicionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍA

Alonso, J. 2004. **Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos**. 1^{ra}. Edición, Editorial Corpus. Argentina.

American Society for testing and Materials. 1994. Annual book of Standards. **Determinación de potasio en agua**. Método ASTM D 2791-93. En Línea: <<http://arturobola.tripod.com/potasio.htm>>. Consulta: 15 de diciembre de 2011.

ANDES/GC. Ecuador. 2010. **Producción petrolera neta de Ecuador asciende a 495.055 barriles diarios**. 30 de octubre. En línea: <<http://andes.info.ec/economia/produccion-petrolera-neta-de-ecuador-asciende-a-495-055-barriles-diarios-35841.html>>. Consulta: 23 de junio de 2011.

ARGENBIO. 2007. **Biorremediación: organismos que limpian el ambiente**. El Cuaderno de Por qué Biotecnología N° 36. En línea: <http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/ec_36.asp?cuaderno=36>. Consulta: 15 de julio de 2010.

Atlas de Buenos Aires, **Aliso de Río**. En línea: <<http://www.atlasdebuenosaires.gov.ar/aaba/images/stories/tematicas/biota/vegetacion/riberena/albardon/alb036.swf>>. Consulta: 01 de noviembre de 2010.

Australian Weeds Committee, **Weed Identification**. National Weeds Strategy. National Weeds Strategy. En línea: <<http://www.weeds.org.au/cgi-bin/weedident.cgi?tpl=plant.tpl&state=&s=&ibra=all&card=W03>>. Consulta: 28 de octubre de 2010.

Ayala, F. 2003. **Taxonomía vegetal, Gymnospermae y Angiospermae de la Amazonía Peruana**. Vol. 1. Iquitos- Perú.

Barba, R. s.f.. **Degradación de xenobiótico**. Universidad Autónoma Gabriel René Moreno, Unidad de Postgrado, Facultad de Ciencias de la Salud Humana. En línea: <<http://www.slideshare.net/miriamvl/biorremediacion>>. Consulta: 12 de diciembre de 2011.

Benavides, J., G. Quintero, A. Guevara, D. Jaimes, S. Gutiérrez, y J. Miranda. 2006. **Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo**. Nova - Publicación Científica ISSN:1794-2470 vol.4 No. 5. En línea: <http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTREVIS1_5.pdf>. Consulta: 10 de octubre de 2010.

Carmona, J., R. Gil, y M. Rodríguez. 2008. **Descripción taxonómica, morfológica y etnobotánica de 26 hierbas comunes que crecen en la ciudad de Mérida-Venezuela**. Universidad de Los Andes, Boletín Antropológico año 26, No. 73, ISSN: 1325-2610. Mérida-Venezuela. En línea: <<http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/30448/1/articulo1.pdf>>. Consulta: 27 de octubre de 2010.

Center for Aquatic and Invasive Plants, University of Florida, IFAS Extension. **Peruvian water primrose**. En línea: <<http://plants.ifas.ufl.edu/node/249>>. Consulta: 27 de octubre de 2010.

Cerón, C. 1995. **Etnobiología de los Cofanes de Dureno: Provincia de Sucumbíos, Ecuador**. Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales, Herbario Nacional, Serie: Monografía, Año 1, marzo 1995, N° 3, Quito-Ecuador. Ediciones Abya-Yala. p. 99.

Colotta, J. s.f.. **Clasificación de sustancias**. En línea: <<http://www.scribd.com/doc/28179429/CLASIFICACION-DE-SUSTANCIAS>>. Consulta: 12 de diciembre de 2011.

Cortés, A. 2007. **Grupo de investigación: Fitoremediación de suelos y sedimentos contaminados**. Universidad de Barcelona. En línea: <http://www.ub.edu/farmacia/recerca/liniesamp/es/amparocortes_es1.html>. Consulta: 20 de mayo de 2010.

Davis, L., S. Castro, Q. Zhang y L. Erickson. 2002. **Benefits of vegetation for soils with organic contaminants**. Crit. Rev. Plant Sci. 21: 457-491.

De La Torre L, H. Navarrete, P. Muriel, M. Macía y H. Balslev. 2008. *Mimosa polydactyla*, *Ludwigia peruviana*, *Tessaria integrifolia*, *Verbena litoralis*. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador, Ecuador, Aarhus-Dinamarca. pp. 237, 353, 475, 618-619.

Diez, J. s.f.. **Fitocorrección de suelos contaminados con metales pesados: evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronómicas**. Tesis Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Biología. Pp. 27-32.

Douglas, M. 1998. **Energía: Tecnología del Petróleo**. Tomo 2. Publicaciones Marcombo S.A. México DF-Barcelona.

Dubois, R. 2005. **Introducción a la Refinación del Petróleo: su historia, la tecnología y su desarrollo, los productos y sus mercados, combustibles alternativos, su economía**. 1^{ra}. Edición, Editorial Eudeba. Buenos Aires- Argentina.

Fernández, L., N. Roja, T. Roldán, M. Ramírez, H. Zegarra, R. Uribe, R. Reyes, D. Flores y M. Arce. 2006. **Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados**. Instituto Mexicano del Petróleo, Secretaría de Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, México, D. F. En línea:

<http://api.ning.com/files/g57QSoJaXEu0xqoxNrO1X6TWiL14opm9lzYkCIH9m70Tlbncl-YhRmf9svcV08pSAfsl4fQRisjFZHBxwYUvwwBnxTlTo*x/ManualContaminacionSuelos.pdf>. Consulta: 17 de mayo de 2010.

González, S. 2007. **La planta y sus nutrientes 3: Conceptos de necesidad y toxicidad**. Publicado por Juan José Ibáñez el 30 de enero. En línea: <<http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2007/01/30/58366>>. Consulta: 15 de octubre de 2011.

Guaranda, W. 2011. Fundación Regional de Asesoría en Derechos Humanos INREDH, **Acciones Judiciales por Derrames de Petróleo**. Boletín. En línea: <http://www.inredh.org/index.php?option=com_content&view=article&id=151%3Aacciones-judiciales-por-derrames-de-petroleo&Itemid=126>. Consulta: 19 de junio de 2011.

Guaranda, W. 2011. Fundación Regional de Asesoría en Derechos Humanos INREDH. **Apuntes sobre la explotación petrolera en el Ecuador**. Boletín. En línea: <http://www.inredh.org/index.php?option=com_content&view=article&id=288%3Aexplotacion-petrolera-en-el-ecuador&Itemid=126>. Consulta: 20 de junio de 2011.

Guzmán, A., S. Sánchez, D. Flores, N. Quevedo y R. Valdés. 2005. **La Biorremediación, un método para descontaminar áreas agrícolas**. Universidad Agraria de La Habana Fructuoso Rodríguez Pérez. p 29. En línea: <<http://www.isch.edu.cu/areas/fitorem/Curso%20Bioquimica%20Vegetal%20Avanzada/Materiales%20didacticos/Monografia%20Biorremediacion.pdf>>. Consulta: 27 de mayo de 2011.

Harvey, P., B. Campanella, P. Castro, H. Harms, E. Lichtfouse, A. R. Schaeffner, S. Smrcek y D. Werck-Reichhart. 2002. **Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons**, anilines and phenols. Environ. Sci. Pollut. Res. 9: 29-47.

Herbario Nacional. 20 de Octubre del 2010. **Informe de Identificación**. Quito-Ecuador.

Ibáñez, J. 2006. **Procesos de contaminación de suelos y tecnologías de remediación (vi). Técnicas Biológicas. Fitorremediación**. Publicado el 24 Octubre. En línea: <<http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2006/10/24/47660>>. Consulta: el 20 de mayo de 2010.

Ibarra, Y., R. Caffo, y M. Ibarra. 2003. **Flora Fanerogámica del Distrito Héroes Albarracín-Tacna**. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Facultad de Ciencias. Perú. p. 38, 46. En línea:

<<http://www.scribd.com/doc/57164283/75/Tessaria-integrifolia>>. Consulta: 9 de enero de 2011.

INEN. 1982. **Mecánica de suelos preparación de muestras alteradas para ensayos, INEN 688, 1982-05**. Ecuador. pp. 1-8.

INEN. 1982. **Mecánica de suelos determinación del contenido de agua, método de sacado al Horno, INEN 690, 1982-05**. Ecuador. pp. 1-7.

INEN. 1986. **Productos de petróleo. Determinación de cenizas INEN 1 492, 1986-11**. Ecuador. pp. 1-3.

Infojardin. s.f.. **Sensitiva, Mimosa sensitiva, Vergonzosa, Planta de la vergüenza, Mimosa púdica**. En línea: <<http://fichas.infojardin.com/perennes-anuales/mimosa-pudica-mimosa-sensitiva.htm>>. Consulta: 15 de diciembre de 2011.

Infraestructura Nacional de Información Biológica (NBII) y UICN / SSC Grupo de Especialistas en Especies Invasoras (ISSG), con el apoyo de la diversidad biológica terrestre y de agua dulce del Sistema de Información (TFBIS). 30 de octubre 2006. **Ludwigia peruviana (aquatic plant)**, En línea: <<http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?fr=1&si=871&sts=>>>. Consulta: 15 de octubre de 2010.

Instituto de Biología. 2007. **Verbena litoralis Kunth - IBUNAM:MEXU:CHASMA193**. UNIBIO: Colecciones Biológicas. 03/10. Universidad Nacional Autónoma de México. En línea: <<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:CHASMA193>>. Consulta: 20 de octubre de 2010.

Instituto de Biología. 2008. *Ludwigia peruviana* (L.) Hara, 1953 - **IBUNAM:MEXU:PA1053459**. UNIBIO: Colecciones Biológicas. 13/10. Universidad Nacional Autónoma de México. En línea:

<<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PA1053459>>.

Consulta: 20 de octubre de 2010.

Instituto de Biología. 2009. *Mimosa polydactyla* Humb. & Bonpl. ex Willd. - **IBUNAM:MEXU:LEG1109055**. UNIBIO: Colecciones Biológicas. 01-04. Universidad Nacional Autónoma de México. En línea:

<<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:LEG1109055>>

Consulta: 10 de octubre de 2010.

Instituto de Ciencias Naturales. 1989. *Tessaria integrifolia* Ruiz & Pav. – **Asteraceae**, Colombia. En línea:

<<http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=358247>>. Consulta: 01 de noviembre de 2010.

Irazusta, M. CONICET. 2009. **Anatomía de raíz de *Tessaria absinthioides* (Hook. & Arn.) DC. y *T. dodoneifolia* ssp.** En línea: <http://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=28554&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=968350>. Consulta: 15 de diciembre de 2011.

ITRC. 2001. **Phytotechnology. Technical and Regulatory Guidance Document**. Interstate Technology and Regulatory Cooperation Work Group Phytotechnologies Work Team. En línea: <http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mbt/maqueda_g_ap/indice.html>. Consulta: 17 de julio de 2010.

Jones, D. 2010. **Producción de petróleo en Ecuador cae 4% en primer semestre de este año.** Newswires 09/08/2010-14:36. En línea: <<http://www.americaeconomia.com/negocios-industrias/produccion-de-petroleo-en-ecuador-cae-4-en-primer-semestre-de-este-ano>>. Consulta: 15 de junio de 2011.

Jørgensen, P. y S. Leon. 1999. **Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador**. Ann. Missouri Botanical Garden. Vol. 75. U.S.A. pp. 311, 599, 629.

Kintto, L. 1999. **El petróleo destruye la Amazonía**. Corresponsal del Servicio Informativo Iberoamericano de la OEI, Quito, Ecuador. En línea: <<http://www.oei.org.co/sii/entrega18/art03.htm>>. Consulta: 23 de Mayo de 2011.

Llorca R. y I. Bautista. 2004. **Prácticas de atmósfera, suelo y agua**. Editorial Alfaomega. México D.F.

Lluch, J. 2008. **Tecnología y margen de Refino del Petróleo**, Editorial Díaz de Santos, Madrid.

López, A. 2003. **Biorremediación y Fitorremediación en Suelos Contaminados**. Universidad Complutense. p 81, 94-98. En línea: <<http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/598/615>>. Consulta: 9 de junio de 2011.

López S., M. Gallegos, L. Pérez y M. Gutiérrez. 2005. **Mecanismos de Fitorremediación de Suelos Contaminados con Moléculas Orgánicas Xenobióticas**. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. año/vol. 21, número 002, Universidad Autónoma de México Distrito Federal. Pp. 91-100. En línea: <<http://www.docstoc.com/docs/38366395/Revista-Internacional-de-Contaminaci%C3%B3n-Ambiental--Mecanismos-de>>. Consulta: 14 de julio de 2010.

López, S. 2008. **Expresión de la actividad enzimática de citocromo p450 en una planta (Cyperus laxus) fitorremediadora de suelos contaminados por hidrocarburos**. Tesis Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, México, D. F. p 7-11. En línea: <<http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp/am/presentatesis.php?recno=14278&docs=UAM I14278.PDF>>. Consulta: 30 de noviembre de 2010.

Lumelli, M. 2002. **Fitorremediación. Alcances y aplicación en el agro ecosistema argentino.** Parte 1, Estructplan Consultora S.A. Argentina. En línea: <<http://www.estrucplan.com.ar/Articulos/verarticulo.asp?IDArticulo=2371>>.

Consulta: 27 de mayo de 2011.

Luque, J. 2009. **Desempeño de Cuatro Especies Vegetales para Fitorremediar Suelos Contaminados con Hidrocarburos en Patagonia,** Tesis de Maestría en Manejo Ambiental, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Trelew. Argentina. En línea: <http://www.inta.gov.ar/chubut/info/documentos/suelos_luque/Fitorremediaci%C3%B3n%20suelos%20contaminados.pdf>. Consulta: el 20 de mayo de 2010.

Machado, R. s.f.. **Botánica de las leguminosas.** En línea: <<http://mvz.unipaz.edu.co/textos/lecturas/pastos-y-forrajes/fundamentos-de-pastos-y-forrajes/lecturas/botanica-de-las-leguminosas.pdf>>. Consulta: 15 de diciembre de 2011.

Maqueda, A. 2003. **Fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados.** Tesis de Maestría en Biotecnología. Departamento de Química y Biología. Escuela de Ciencias. Universidad de las Américas, Puebla. México. Apéndice D. **Factores técnicos para los sistemas de fitorremediación.** Pp. 122-128. En línea: <http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mbt/maqueda_g_ap/indice.html>. Consulta: 17 de julio de 2010.

Marquez, R. s.f.. **Análisis de Laboratorio, Estudio de Suelo.** En línea: http://webdelprofesor.ula.ve/ingenieria/marquezronald/wp-content/uploads/An_3411isis-Laboratorio.pdf. Consulta: 15 de diciembre del 2011.

Martínez, A., R. Grether & R. González. 2008. **Flora de Veracruz, LEGUMINOSAE I: Mimosa.** Instituto de Ecología A. C. Fascículo 147. Xalapa, Veracruz, México. p. 85-86. En línea: <http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOVER/147-Martinez_Bernal.pdf>. Consulta: 26 de octubre de 2010.

Matthei. 1995. **Medicamentos tradicionales.** Chile. En línea: <<http://www.redsalud.gov.cl/portal/url/item/7d9a8480e08d1613e04001011e01021b.pdf>>. Consulta: 10 de noviembre de 2010.

Medina, M. 23 de marzo del 2011. **Historia del petróleo en el Ecuador.** En línea: <<http://es.scribd.com/doc/56679915/Historia-del-Petroleo-en-el-Ecuador>>. Consulta: 16 de mayo de 2011.

Méndez, J., C. Roque, K. Zapata y V. Otahola. 2004. **Effect of oil concentration and contamination period on seed germination of corn (*Zea mays* L.) cv. Himeca 95.** Revista Científica UDO Agrícola Vol. 4, Núm. 1, pp. 66-71.
En línea: <<http://www.bioline.org.br/request?cg04008>>. Consulta: 08 de junio de 2010.

Mendoza, M. y M. Gómez. 2002. **La biorremediación suelos contaminados con hidrocarburos. Teorema Ambiental Revista Técnico Ambiental.** Publicación de 3W México. En línea: <http://www.teorema.com.mx/contaminacion_/biorremediacion-de-suelos-contaminados-con-hidrocarburos/>. Consulta: 24 de mayo de 2010.

Mentaberry, A. 2011. **Fitorremediación,** Agrobiotecnología, Curso 2011, Universidad de Buenos Aires. En línea: <http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/agbt/teoricos/2011_17%20Fitorremediacion.pdf>. Consulta: 25 de mayo de 2011.

Miliarium, A. 2004. **Fitocorrección *in situ*,** Ingeniería Civil y Ambiente. En línea: <<http://www.miliarium.com/prontuario/tratamientosuelos/Fitorremediacion.htm>>. Consulta: 15 de julio de 2010.

Miller, R. 1996. **Phytoremediation: Ground-Water Remediation.** The Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center, Technology Overview Report TO-96-03. p. 8. En línea: <http://www.environmental-expert.com/Files/0/articles/875/Phyto_o.pdf>. Consulta: el 16 de julio de 2010.

Ministro de Energía y Minas. Reglamento Sustitutivo del Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador RAOHE, Decreto No. 1215, publicado en el Registro Oficial No. 265 de 13 de Febrero de 2001. **Instructivo para la Calificación y Registro de Consultores Ambientales Hidrocarburíferos**, Cap. XII Límites Permisibles, Anexo 2, Tabla 6, p. 57. En línea: <<http://es.scribd.com/doc/59394617/reglamento1215-RAOHE>>. Consulta: 21 de mayo de 2011.

Mujica, C., J. Méndez y F. Pino. 2006. **Crecimiento de plántulas de Frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) en dos suelos contaminados con petróleo**. Revista Tecnológica ESPOL, Vol. 19, N. 1, 17-24, octubre, ISSN : 0257-1749. Departamento de Agronomía. Escuela de Ingeniería Agronómica y Escuela de Petróleo. Núcleo de Monagas. Universidad de Oriente. Venezuela.

Núñez, R., Y. Meas, R. Ortega y E. Olguín. 2004. **Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones**. México. Pp. 69-82. En línea: <http://suel.wikispaces.com/file/view/Fitorremediacion_Fundam_Aplic.pdf>. Consulta: 13 de diciembre de 2011.

Olguín, E., M. Hernández y G. Sánchez. 2007. **Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de Biorremediación, fitorremediación y restauración**. Rev. Int. Contam. Ambient. 23 (3) 139-154. Unidad de Biotecnología Ambiental. Instituto de Ecología, A.C. (INECOL), Congregación El Haya. Xalapa, Veracruz, 91070. México. En línea: <http://www.atmosfera.unam.mx/editorial/rica/acervo/vol_23_3/4.pdf>. Consulta: 16 de octubre de 2011.

Ortiz, C. 2004. **Plantas Que Limpian El Ambiente: Aplicaciones de La Fitorremediación en Chile**. Revista de Bioquímica PUCV Online, No. 5. Chile. Pp. 8-11. En línea: <<http://www.bioquimica.ucv.cl/documentos/revista/revista%20n5.pdf>>. Consulta: 15 de julio de 2010.

Ortega, H., A. Benavides, R. Arteaga y A. Zermeño. 2009. **Fitorremediación de Suelos Contaminados con Metales Pesados**. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México. Pp. 124-147. En línea: <http://abenmen.com/a/Nutricion_Vegetal-4.pdf>. Consulta: 13 de diciembre de 2011.

Panreac Química S.L.U. s.f.. **Determinación de Nitrógeno por el Método Kjeldahl**. En línea: <http://www.panreac.es/pdf/determinacion_nitrogeno_esp.pdf>. Consulta: 15 de diciembre del 2011.

Peña, J., B. Barrera, R. Ruiz, B. Xoconostle. 2006. **Bases moleculares de la fitorremediación de hidrocarburos totales del petróleo**. Redalyc Sistema de Información Científica Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. TERRA Latinoamericana, Vol. 24, Núm. 4, octubre-diciembre. Universidad Autónoma Chapingo. México, pp. 529-539. En línea: <<http://redalyc.uaemex.mx/pdf/573/57324411.pdf>>. Consulta: 15 de octubre de 2011.

Pérez, F., F. Rodríguez, A. Sagástegui. 2007. **Estudio fitoquímico preliminar de *Tessaria integrifolia* R. et P.** Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad Privada Antenor Orrego, Vol. 1, N° 1. p. 6-8. Trujillo - Perú. <http://www.upao.edu.pe/publicaciones/ciencias_salud/REVISTA_FACULTAD_ciencias_salud.pdf>. Consulta: 23 de octubre de 2010.

Pérez, J., I. Castillo, y D. Paz. 2006. **Asimilación de cadmio y plomo por tabaco cv. "Criollo 98" en un suelo contaminado artificialmente. Parte I: características morfológicas de la planta.** *Revista Centro Agrícola*, año 33, no 4. pp. 47-53, Academic Search Complete, EBSCOhost. Consulta: 09 de octubre de 2011.

Pezeshki, S., M. Hester, Q. Lin y J. Nyman. **The effects of oil spill and clean up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: A review**. *Environ. Pollut.* 108, 2000, pp. 129-139.

Plastes, E. 2005. **La Ciencia del Suelo y su Manejo**. 1^{ra} Edición, Editorial Thomson, Madrid- España.

Red Nacional de Jardines Botánicos. 2008. ***Tessaria integrifolia* Ruiz & Pav.** **Catálogo de biodiversidad de Colombia**, 5 enero 2009. Colombia. En línea: <<http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=2100&method=displayAAT>>. Consulta: 9 de enero de 2011.

Rivera, M., A. Trujillo, A. Miranda y E. Maldonado. 2005. **Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleos nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas**. Interciencia 30 no. 6. pp. 326-331.

Saad, I., J. Castillo y D. Rebolledo. 2009. **Fitorremediación: estudio de inteligencia tecnológica competitiva**. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 1-13. En línea: <http://octi.guanajuato.gob.mx/sinnco/formulario/MT/MT2009/MT2/SESSION4/MT24_MSAAD_041.pdf>. Consulta: 20 de julio de 2010.

Salt, D., R. Smith e I. Raskin. 1998. **Phytoremediation**. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 643-668.

Sarango, V. 2008. **Determinación de la actividad antidiabética de los extractos totales de nueve especies vegetales nativas del Sur del Ecuador: *Piper crassinervium* (Guabiduca), *Baccharis genistelloides* (Tres filos), *Neonelsonia acuminata* (Zanahoria blanca), *Siparuna eggersii* (Monte de oso), *Ilex guayusa* (Guayusa), *Croton wagneri* (Mosquera), *Costus comosus* (Caña agria), *Verbena littoralis* (Verbena) y *Oreocallis grandiflora* (Cucharillo) mediante ensayos de inhibición de alfa amilasa y alfa glucosidasa**. Tesis de grado Universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Ecuador. p. 36

Serkovic, S. ***Verbena littoralis* H.B.K. y *V. officinallis* H.B.K**

En línea: <<http://www.maca-peruana.com/verbena.htm>>. Consulta: 28 de julio de 2010.

Siegel, S. 1978. **Estadística No Paramétrica para Ciencias de la Conducta**. Litográfica INGRAMEX. México D.F.

Sierra R. 2006. **Fitorremediación de un Suelo Contaminado con Plomo por Actividad Industrial**, Tesis Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. División de Ingeniería Departamento de Ciencias del Suelo, Coahuila, México.

Silva, S. 2010. **DATOS-Explotación petrolera en Ecuador**. Reuters América Latina, 23 de noviembre. En línea: <<http://lta.reuters.com/article/businessNews/idLTASIE6AN03020101124?sp=true>>. Consultado el 15 de junio de 2011.

Stevens, D., C. Ulloa, A. Pool y O. Montiel. 2001. **Flora de Nicaragua**, Tomo II, Missouri Botanical Garden Press. Volumen 85, Nicaragua.

Strathfield Council, Environmental Services Sydney, **Weed Fact Sheet, “Ludwigia peruviana”**. Sydney. En línea: <<http://www.strathfield.nsw.gov.au/system/files/f2/f36/f37/o462//WEED%20INFORMATION%20SHEET%20-%20Ludwigia%20peruviana.pdf>>. Consulta: 28 de octubre de 2010.

The New York Botanical Garden. 1995. **Taxonomy details**. En línea: <<http://sweetgum.nybg.org/vh/taxon.php?irn=145892>>. Consulta: 20 de noviembre de 2010.

Torres, K. y T. Zuluaga. 2009. **Biorremediación de Suelos Contaminados por Hidrocarburos**, Tesis Universidad Nacional de Colombia Facultad de Minas Ingeniería Química, Medellín. pp 60, 63.

US EPA. 2000. **Introduction to Phytoremediation EPA/600/R-99/107, U.S. Environmental Protection Agency. National Risk Management Research Laboratory. Office of Research and Development Cincinnati, Ohio**. En línea: <http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mbt/maqueda_g_ap/indice.html>. Consulta: 17 de julio de 2010.

Vogliano, S. 2009. **ECUADOR – Extracción petrolera en la Amazonía**. Proyecto Cultura y Ambiente, Conflictos Socioecológicos, Combustibles fósiles, Ficha N° 2. p. 5. En línea: <http://www.fuhem.es/media/ecosocial/image/culturambiente/fichas/ECUADOR_combustibles_n22.pdf>. Consulta: 28 de julio de 2010.

Wauquier, J., J. Roussel y R. Boulet. 2004. **El Refino del Petróleo, Cap. Composición de los petróleos y de los productos petrolíferos**. Editorial Días de Santos, Madrid-España.

Zuñiga, A. y S. Ortiz. s.f. **Herbario de arvenses**. En línea: <<http://dc394.4shared.com/doc/ZdpVChEX/preview.html>>. Consulta: 20 de diciembre de 2011.

Comunicaciones personales:

Paco Noriega, Coordinador del Área de Ciencias de la Vida, Universidad Politécnica Salesiana, Quito. Enero, 2011.

En línea:

Bioplus.

<<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/349/1/13T0643%20ZURITA%20ROSA.pdf>>. Consulta: 29 de julio de 2010.

Biosurfactantes.

<http://personal.us.es/evpolo/pdf/trab_dirig/pinedorevilla_trigochoyda.pdf>. Consulta: 15 de diciembre de 2011.

Monitor. <http://www.proficol.com.co/docs/ficha_tecnica/43MONITOR.pdf>. Consulta: 29 de julio de 2010.

Mapa en Figura 2: <<http://www.maps.google.com>>. Consulta: 01 de noviembre de 2011.

ANEXOS

Anexo 1. SALIDAS DE CAMPO

PAPALLACTA



*El Tambo, coordenadas UTM 17M0812828; 9959649,
Sitio por donde bajo el petróleo producto del derrame*

BAEZA, comunidad Cuyuja



*Área directamente afectada
Coordenadas UTM:
17M 0833678; 9952985, a 2292msnm.*



*Proceso de remediación: Delimitación
del lugar con prohibición de acceso
y Zanjas de control de derrame.*

EL CHACO, Sector Piedra Fina



Estanque delimitado con geomembrana.



Escobilla creciendo en suelo muy contaminado.



*Árbol y plántula de Olivo (*Tessaria integrifolia*)*

Sector Piedra Fina: Derrame en proceso de Remediación



*Especie reconocida como Ludwigia peruviana,
escobilla nombre común en el sector de Piedra Fina.*



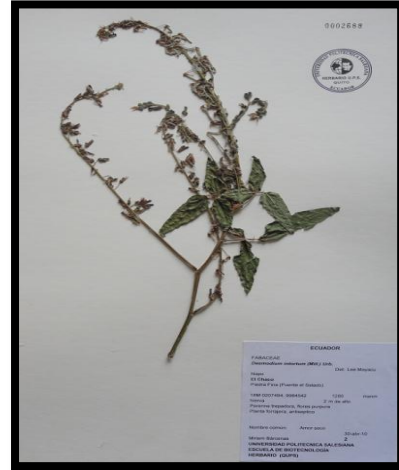
Plántulas de olivo y escobilla.

Anexo 2. PLANTAS MUESTREADAS EN LAS VISITAS DE CAMPO.

Plantas Posibles Fitorremediadoras de Hidrocarburos (de las cuales se seleccionó cuatro especies).



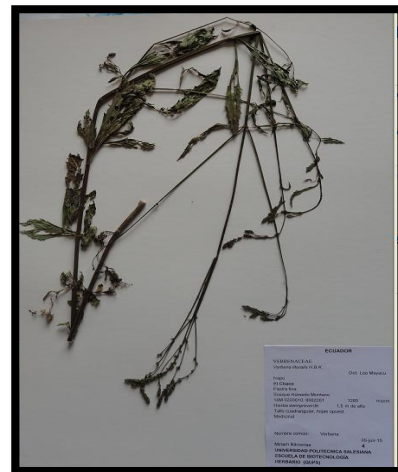
Calopogonium mucunoides Desv.



Desmodium intortum (Mill.) Urb.



Ludwigia peruviana (L.) H. Hara.



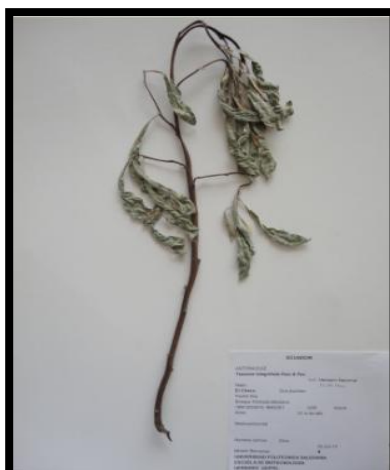
Verbena litoralis Kunth.



Mimosa polydactyla Hum & Boonl. ex Will.



Pennisetum purpureum. Schumach.



Tessaria integrifolia Ruiz & Pav.

Anexo 3. DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL SUELO AL INICIO DE LA INVESTIGACIÓN

Determinación de Cenizas Totales (Materia Orgánica)



Crisoles en desecador luego de incineración en Mufla a 600°C

Determinación de pH

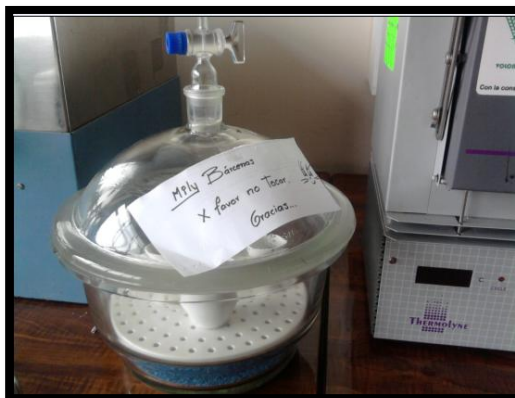


Agitación de las muestras de Suelo en agua.



Determinación del pH mediante tirillas de medición.

Determinación de Humedad



Cápsulas con muestras secas enfriándose en desecador.

Anexo 4. ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS MEDIANTE MÉTODO DE SOXHLET EN EL CIVABI-UPS AL INICIO DE LA INVESTIGACIÓN



Extracción de Hidrocarburos de petróleo en equipo Soxhlet.



*Desecación de extracto obtenido,
en rotaevaporador.*

Anexo 5. PREPARACIÓN DEL SUSTRATO CON LAS CONCENTRACIONES DETERMINADAS DE PETRÓLEO.



Mezclado de petróleo pesado con la tierra.



Petróleo pesado



Disposición en bolsas plásticas.

Anexo 6. INSTALACIÓN DEL SITIO DE TRABAJO (AMBIENTE CONTROLADO DE LLUVIA E INSOLACIÓN EXCESIVA)



Ubicación de las fundas con sustrato preparado a las concentraciones de hidrocarburos determinadas en el diseño experimental.

Anexo 7. RECOLECCIÓN ESPECIES SELECCIONADAS COMO POSIBLES FITORREMEDIADORAS.



Recolección de las plantas en las cercanías de la comunidad de San Luis.

Anexo 8. TRASPLANTE Y ROTULACIÓN DE PLANTAS A LOS TRATAMIENTOS DE FITORREMEDIACIÓN



Ubicación de las plantas recolectadas en el invernadero.



Trasplante de las plantas recolectadas en campo.

Anexo 9. MONITOREO Y CONTROL DE INDIVIDUOS VEGETALES BIO-REMEDIADORES



Toma de datos de las plantas trasplantadas (altura, No. de hojas, etc.)



*Disposición final de las plantas
Recolectadas y trasplantadas, en el sitio de trabajo.*



Riego de las plantas



Cambio de cubierta del sitio de trabajo para control de exceso de lluvia e insolación.



Medición de Mimosa polydactyla.



Cabezuelas de frutos de Mimosa polydactyla.



Medición de Verbena litoralis



Flores de Verbena litoralis



Toma de datos de Tessaria integrifolia



Ludwigia peruviana

Anexo 10. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE SUELOS PARA ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS AL FINAL DE LA INVESTIGACIÓN

Secado de Suelos de los Tratamientos de Fitorremediación (5 meses después).



Secado de sustratos (tierra contaminada con petróleo a concentraciones determinadas) en periódicos a temperatura ambiente.

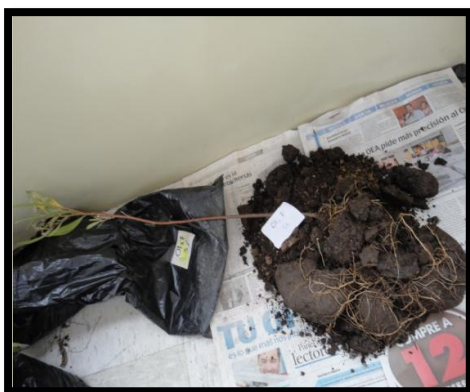
Observación de la raíces de cada una de las cuatro especies con posible potencial fitorremediador



*Raíces de la especie
Mimosa polydactyla.*



*Raíces de la especie
Ludwigia peruviana.*



Observación de las raíces de la especie Tessaria integrifolia



Observación de las raíces de la especie Verbena litoralis

Tamizaje de los sustratos contaminados con petróleo pesado sometidos a tratamientos de fitorremediación durante 5 meses.



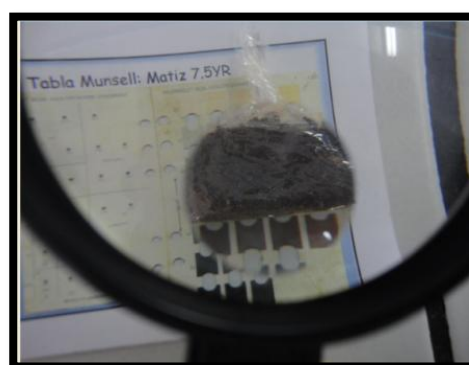
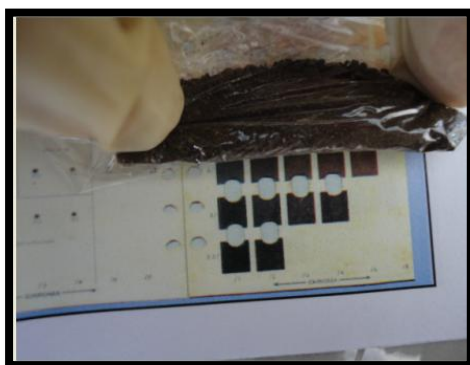
Anexo 11. DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL SUELO AL FINAL DE LA INVESTIGACIÓN

Almacenamiento de Muestras



Rotulación y almacenamiento de muestras de suelo.

Determinación de Color en Tabla de Munsell



Determinación de color de las muestras de suelo obtenidas de los tratamientos de fitorremediación aplicados en la investigación.



Comparación de color de las muestras por especie de planta mediante la cual se trató el sustrato y por tratamientos.

Determinación de Textura



Pasos para la determinación de Textura mediante un método manual, en muestras de suelo contaminados con petróleo.

Determinación de pH



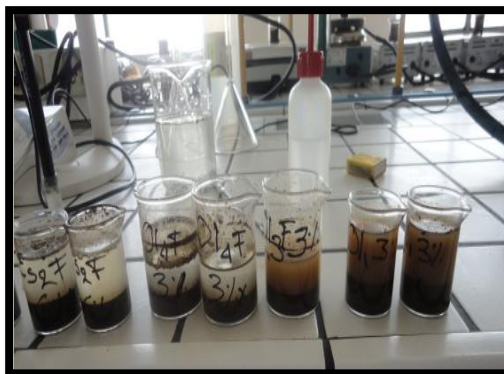
Agitación de las muestras de suelos para determinación de pH.



Potenciómetro



Determinación de pH mediante el potenciómetro luego de la agitación.

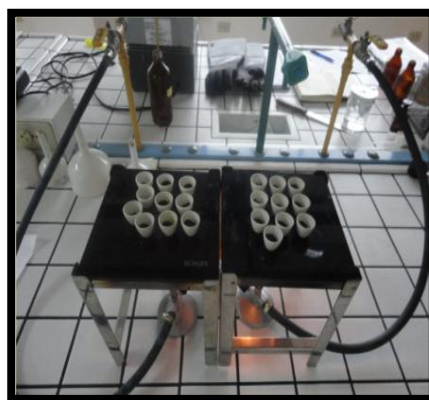


Muestras de suelo en Agua luego de la agitación.

Determinación de Cenizas Totales (Materia Orgánica)



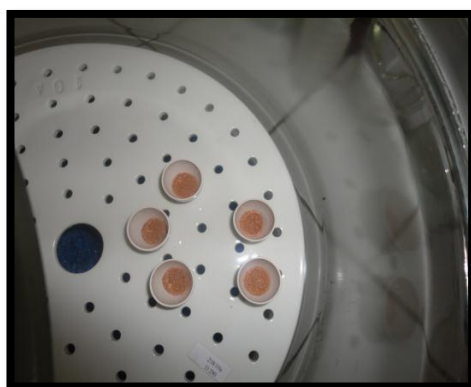
Peso de 1g. de muestra de suelo en un crisol tarado.



Incineración de las muestras de suelo en mecheros Bunsen para determinación de cenizas totales.



Incineración de las muestras de suelo en la mufla a 600°C.



Crisoles en reposo en desecador luego de incineración en Mufla.



Pesaje de las muestras Incineradas.

Determinación de Humedad



Secado de las muestras en cápsulas previamente taradas en estufa a 105°C.



Reposo de las muestras en desecador, luego del secado en estufa.



Pesaje de las muestras de suelo para determinación de Humedad.

Preparación de muestras para ser enviadas a AGROCALIDAD para análisis de Nitrógeno, Fósforo y Potasio.



Muestras empacadas en bolsas de zimploc y rotuladas para enviar a los respectivos análisis.

Anexo 12. ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS MEDIANTE MÉTODO DE GRAVIMÉTRICO



Reactivo utilizado como solvente para determinación de TPH.



Material tarado en desecador utilizado para la determinación de TPH (Hidrocarburos Totales de Petróleo).



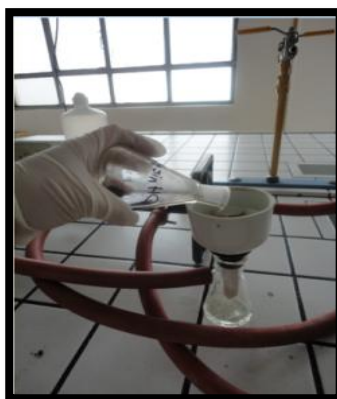
Pesaje de 5g de las muestras de suelo en matraces para agitación.



Agitación de las muestras de suelo con diclorometano (solvente), dentro de la Sorbona para evitar contaminación del ambiente por evaporación del solvente.



Filtrado de muestras de suelos contaminados con 3 y 6% de petróleo Tratados por fitorremediación, luego de la agitación.



Filtrado de muestras de suelos sin contaminación de petróleo tratados por fitorremediación, luego de la agitación.



Aforado del extracto obtenido de la agitación de las muestras de suelos con Diclorometano.



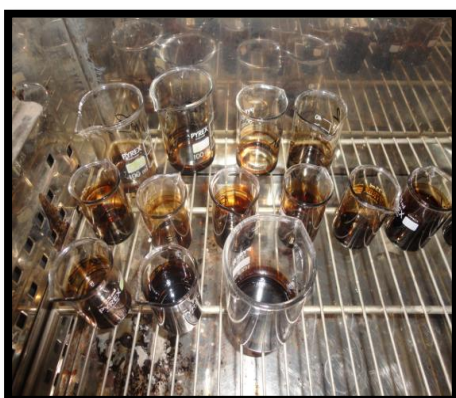
Extractos de las muestras de suelos contaminados con petróleo, colocados en vasos de precipitación previamente tarados evaporación y determinación de PTH.



Extractos de las muestras de suelos contaminados con petróleo.



Extractos de las muestras de suelos sin contaminación de petróleo.



Secado de los vasos de precipitación con extracto evaporado de las muestras de suelos en estufa a 40°C para eliminar humedad del ambiente.



Enfriamiento de los vasos de precipitación con extracto evaporado de las muestras de suelos, en desecador para su posterior pesaje y determinación de TPH.

**Anexo 13. DATOS REGISTRADOS DURANTE 5 MESES DEL ENSAYO DE
FITORREMEDIACIÓN**

Datos del crecimiento en altura (cm) de las cuatro especies estudiadas:

<i>Ludwigia peruviana</i> promedios de altura (cm)						
Tiempo (días)	Ludper 3% de petróleo	Ludper 6% de petróleo	Ludper sin petróleo	Ludper 3% de petróleo, Fert.	Ludper 6% de petróleo, Fert.	Ludper sin petróleo, Fert.
0	18.3	17.3	17.8	22.0	19.0	16.5
33	19.1	16.3	19.1	21.3	19.6	15.8
74	19.9	16.4	20.3	21.7	20.4	18.3
120	19.6	16.6	21.5	19.7	20.8	21.5
134	19.9	17.0	21.8	19.7	20.8	21.9
147	20.6	17.6	22.8	20.7	21.3	23.0

<i>Mimosa polydactyla</i> promedios de altura (cm)						
Tiempo (días)	Mimp 3% de petróleo	Mimp 6% de petróleo	Mimp sin petróleo	Mimp 3% de petróleo, Fert.	Mimp 6% de petróleo, Fert.	Mimp sin petróleo, Fert.
0	24.3	31.3	24.0	17.6	19.1	21.5
33	24.6	31.4	23.6	18.0	19.4	21.9
74	25.6	32.6	24.4	18.8	19.6	23.2
120	24.4	30.4	24.9	18.9	19.0	24.2
134	24.4	30.5	25.0	18.9	19.0	24.8
147	24.5	30.8	25.1	18.8	18.8	25.1

<i>Tessaria integrifolia</i> promedios de altura (cm)						
Tiempo (días)	Tesint 3% de petróleo	Tesint 6% de petróleo	Tesint sin petróleo	Tesint 3% de petróleo, Fert.	Tesint 6% de petróleo, Fert.	Tesint sin petróleo, Fert.
0	30.8	25.5	20.3	28.8	25.5	31.0
33	32.9	28.9	24.1	29.8	28.9	37.5
74	35.3	33.0	34.9	34.3	30.3	42.5
120	37.8	33.0	36.0	34.5	31.3	45.5
134	38.8	33.1	37.3	33.8	31.1	46.0
147	40.8	35.5	39.8	32.8	31.1	48.3

<i>Verbena litoralis</i> promedios de altura (cm)						
Tiempo (días)	Verb 3% de petróleo	Verb 6% de petróleo	Verb sin petróleo	Verb 3% de petróleo, Fert.	Verb 6% de petróleo, Fert.	Verb sin petróleo, Fert.
0	46.5	37.6	38.5	35.5	35.8	22.3
33	50.6	41.8	47.1	39.5	44.0	37.3
74	52.3	43.5	48.5	42.8	45.6	47.6
120	54.0	44.8	58.8	48.8	46.5	69.5
134	55.0	44.5	62.3	49.8	47.5	70.0
147	56.0	46.0	62.6	51.0	45.0	67.1

Datos del desarrollo de biomasa (No. de hojas) de las cuatro especies estudiadas:

<i>Ludwigia peruviana</i> promedios de N° de hojas						
Tiempo (días)	Ludper 3% de petróleo	Ludper 6% de petróleo	Ludper sin petróleo	Ludper 3% de petróleo, Fert.	Ludper 6% de petróleo, Fert.	Ludper sin petróleo, Fert.
0	87.8	40.0	52.5	27.0	22.0	32.0
33	66.3	21.3	37.0	31.8	23.0	41.5
62	45.0	18.8	34.3	13.8	12.0	30.8
74	53.8	21.3	42.3	20.5	24.0	43.0
99	50.5	27.3	52.8	30.5	30.8	44.5
120	63.8	31.0	50.8	40.5	22.0	48.5
134	48.5	29.8	61.0	40.0	21.3	30.8
147	43.3	33.3	96.3	64.8	38.8	132.8

<i>Mimosa polydactyla</i> promedios N° de hojas						
Tiempo (días)	Mimp 3% de petróleo	Mimp 6% de petróleo	Mimp sin petróleo	Mimp 3% de petróleo, Fert.	Mimp 6% de petróleo, Fert.	Mimp sin petróleo, Fert.
0	18.0	23.3	17.0	9.2	17.5	17.0
33	13.5	14.0	16.8	6.2	12.3	9.3
62	2.5	5.0	17.8	4.5	7.8	12.8
74	5.3	6.8	17.6	4.2	6.0	13.0
90	4.3	4.8	13.2	4.8	6.0	8.0
99	2.8	4.8	10.0	7.2	6.3	11.5
120	5.3	7.5	7.4	4.5	3.3	11.3
134	7.0	8.3	12.8	3.3	3.8	10.5
147	13.3	11.3	17.2	5.2	2.0	17.5

<i>Tessaria integrifolia</i> promedios de N° de hojas						
Tiempo (días)	Tessar 3% de petróleo	Tessar 6% de petróleo	Tessar sin petróleo	Tessar 3% de petróleo, Fert.	Tessar 6% de petróleo, Fert.	Tessar sin petróleo, Fert.
0	30.5	23.8	15.8	17.3	18.0	13.5
33	35.5	38.3	27.5	11.3	12.0	35.3
74	20.0	16.0	60.8	5.0	13.5	55.8
90	14.3	10.8	49.5	3.5	6.8	17.5
99	9.8	10.8	32.0	2.3	10.5	38.5
120	12.0	10.3	31.3	6.0	12.0	30.0
134	8.8	14.3	30.3	6.3	8.0	26.0
147	15.5	25.3	70.8	10.8	12.5	64.3

<i>Verbena litoralis</i> promedios de N° de hojas						
Tiempo (días)	Verlit 3% de petróleo	Verlit 6% de petróleo	Verlit sin petróleo	Verlit 3% de petróleo, Fert.	Verlit 6% de petróleo, Fert.	Verlit petróleo, Fert.
0	49.8	34.0	48.8	51.3	25.3	25.3
33	28.5	11.0	47.5	23.8	5.0	29.0
74	16.8	7.5	44.8	21.5	15.0	33.5
90	4.3	13.3	12.8	12.3	4.8	18.3
99	11.8	8.8	20.5	11.0	8.5	19.5
120	12.5	8.0	12.0	11.3	6.5	18.3
134	8.0	7.0	17.0	15.0	5.8	17.3
147	11.3	5.0	19.0	15.5	7.0	21.8

**Anexo 14. RESULTADOS DE RESULTADOS DE ANÁLISIS EDÁFICOS
FINALES**

Especies y tratamientos		Métrica	pH	% M.O.	% Humedad	% N	P (ppm)	K (Cmol/kg)	g TPH en 4kg Suelo Seco
<i>Ludwigia peruviana</i>	sin HC	$\bar{x}$	6,41	9,49	4,82	0,24	2,00	0,15	2,39
		D.E	0,58	0,07	0,07	0,00	0,00	0	-
		n	2	2	2	2	2	2	1
	3% de HC	$\bar{x}$	5,97	14,14	7,28	0,36	1,00	0,2	116,26
		D.E	0,09	2,52	3,19	0,16	0,00	3,399E-17	0,52
		n	3	3	3	3	3	3	3
	6% de HC	$\bar{x}$	5,95	16,00	6,04	0,30	1,00	0,2	236,39
		D.E	0,08	2,54	2,76	0,14	0,00	3,399E-17	21,41
		n	3	3	3	3	3	3	3
	sin HC, Fertilizada	$\bar{x}$	6,05	12,38	6,82	0,34	5,00	0,20	4,06
		D.E	0,58	0,33	0,01	0,00	0,00	0,00	-
		n	2	2	2	2	2	2	1
	3% de HC, Fertilizada	$\bar{x}$	5,94	18,03	11,86	0,59	1,00	0,15	133,53
		D.E	0,10	3,72	5,56	0,28	0,00	0,00	25,12
		n	3	3	3	3	3	3	3
	6% de HC, Fertilizada	$\bar{x}$	5,83	18,01	9,81	0,49	1,00	0,15	235,41
		D.E	0,11	4,54	6,30	0,31	0,00	0,00	9,44
		n	3	3	3	3	3	3	3
<i>Mimosa polydactyla</i>	sin HC	$\bar{x}$	5,99	13,04	8,58	0,43	1,00	0,25	4,99
		D.E	0,19	5,71	5,95	0,30	0,00	0,00	-
		n	2	2	2	2	2	2	1
	3% de HC	$\bar{x}$	5,94	20,93	16,30	0,82	1,00	0,20	130,45
		D.E	0,10	3,79	5,86	0,29	0,00	3,399E-17	8,05
		n	3	3	3	3	3	3	3
	6% de HC	$\bar{x}$	6,01	24,34	17,96	0,90	1,00	0,15	236,15
		D.E	0,13	0,24	1,10	0,05	0,00	0,00	13,28
		n	3	3	3	3	3	3	3
	sin HC, Fertilizada	$\bar{x}$	5,51	11,48	9,41	0,47	2,00	0,20	11,15
		D.E	0,60	0,70	3,66	0,18	0,00	0,00	-
		n	2	2	2	2	2	2	1
	3% de HC, Fertilizada	$\bar{x}$	5,94	19,96	15,38	0,77	1,00	0,20	119,04
		D.E	0,08	6,94	9,81	0,49	0,00	3,399E-17	13,81
		n	3	3	3	3	3	3	3
	6% de HC, Fertilizada	$\bar{x}$	6,04	17,94	8,40	0,42	1,00	0,15	237,28
		D.E	0,03	2,64	3,65	0,18	0,00	0,00	22,04
		n	3	3	3	3	3	3	3

$\bar{x}$ = Promedio; D.E.= Desviación Estándar; n= tamaño de muestra
HC= Hidrocarburos

Anexo 14. (continuación)

Especies y tratamientos		Métrica	pH	% M.O.	% Humedad	% N	P (ppm)	K (Cmol/kg)	g TPH en 4kg Suelo Seco
<i>Tessaria integrifolia</i>	sin HC	$\bar{x}$	5,34	19,49	9,45	0,47	10,00	0,25	6,21
		D.E	0,58	3,24	0,87	0,04	0,00	0,00	-
		n	2	2	2	2	2	2	1
	3% de HC	$\bar{x}$	6,01	24,10	20,94	1,05	1,00	0,20	126,72
		D.E	0,14	1,20	2,25	0,11	0,00	3,399E-17	7,05
		n	3	3	3	3	3	3	3
	6% de HC	$\bar{x}$	6,05	19,05	10,98	0,55	1,00	0,20	254,08
		D.E	0,10	3,63	5,17	0,26	0,00	0,00	30,44
		n	3	3	3	3	3	3	3
	sin HC, Fertilizada	$\bar{x}$	5,37	22,32	16,94	0,85	1,00	0,20	8,14
		D.E	0,01	7,49	8,14	0,41	0,00	0,00	-
		n	2	2	2	2	2	2	1
	3% de HC, Fertilizada	$\bar{x}$	5,98	24,72	22,32	1,12	1,00	15,00	117,36
		D.E	0,15	2,03	3,31	0,17	0,00	0,00	5,27
		n	3	3	3	3	3	3	3
	6% de HC, Fertilizada	$\bar{x}$	6,06	24,19	17,88	0,89	1,00	0,20	236,94
		D.E	0,08	1,82	2,79	0,14	0,00	3,399E-17	4,98
		n	3	3	3	3	3	3	3
<i>Verbena litoralis</i>	sin HC	$\bar{x}$	6,17	14,36	11,33	0,57	2,00	0,15	4,23
		D.E	0,30	4,40	5,79	0,29	0,00	0,00	-
		n	2	2	2	2	2	2	1
	3% de HC	$\bar{x}$	5,89	20,24	15,72	0,79	1,00	0,20	119,83
		D.E	0,07	6,05	8,84	0,44	0,00	3,399E-17	2,93
		n	3	3	3	3	3	3	3
	6% de HC	$\bar{x}$	6,01	23,55	16,86	0,84	1,00	0,15	264,04
		D.E	0,17	1,95	3,15	0,16	0,00	0,00	5,69
		n	3	3	3	3	3	3	3
	sin HC, Fertilizada	$\bar{x}$	6,00	18,09	15,46	0,77	2,00	0,15	1,49
		D.E	0,32	4,11	5,40	0,27	0,00	0,00	-
		n	2	2	2	2	2	2	1
	3% de HC, Fertilizada	$\bar{x}$	5,95	22,94	19,00	0,95	1,00	0,20	123,74
		D.E	0,07	4,26	6,87	0,34	0,00	3,399E-17	2,00
		n	3	3	3	3	3	3	3
	6% de HC, Fertilizada	$\bar{x}$	5,96	23,61	18,11	0,91	1,00	0,25	245,71
		D.E	0,21	2,16	2,84	0,14	0,00	0,00	13,24
		n	3	3	3	3	3	3	3
Sin Planta	3% de HC	$\bar{x}$	5,86	16,68	10,13	0,51	1,00	0,20	141,26
		D.E	0,01	0,46	0,83	0,04	0,00	0,00	9,94
		n	2	2	2	2	2	2	2
	6% de HC	$\bar{x}$	5,91	18,62	8,74	0,44	1,00	0,15	265,53
		D.E	0,05	1,21	2,19	0,11	0,00	0,00	2,51
		n	2	2	2	2	2	2	2
	3% de HC, Fertilizada	$\bar{x}$	5,91	15,98	9,40	0,47	1,00	0,25	141,91
		D.E	-	-	-	-	-	-	-
		n	1	1	1	1	1	1	1
	6% de HC, Fertilizada	$\bar{x}$	5,79	19,79	10,93	0,55	1,00	0,20	264,31
		D.E	-	-	-	-	-	-	-
		n	1	1	1	1	1	1	1

$\bar{x}$ = Promedio; D.E.= Desviación Estándar; n= tamaño de muestra; HC= Hidrocarburos