

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

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

TEMA:

**“EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE SUELOS
CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS UTILIZANDO *Aspergillus*
niger, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa*”**

AUTORES

**TANYA CAROLINA CEVALLOS PAGUAY
JONATHAN DARÍO GARCÍA DÍAZ**

TUTORA

LAURA ELIZABETH HUACHI ESPÍN

Quito, Julio del 2018

Cesión de derechos de autor

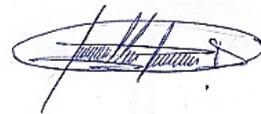
Nosotros Tanya Carolina Cevallos Paguay y Jonathan Darío García Díaz con documento de identificación N° 1750596817 y N° 1721820833 respectivamente, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: "Evaluación de la biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa*", mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera e Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

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



.....
Tanya Carolina Cevallos Paguay

1750596817



.....
Jonathan Darío García Díaz

1721820833

Quito, Julio 2018

Declaratoria de coautoría del docente tutora

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “Evaluación de la biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa*”, realizado por Tanya Carolina Cevallos Paguay y Jonathan Darío García Díaz, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerado como trabajo final de titulación.



.....
Laura Elizabeth Huachi Espín

C.I: 1711113744

Quito, Julio 2018

Dedicatoria

A Dios por guiarnos, cuidarnos, darnos fuerza y sabiduría a cada momento.

A nuestra hija Samantha quien es nuestra inspiración para seguir adelante siempre dando lo mejor de nosotros.

A nuestros padres por su guía y apoyo diario, porque sin ellos no estaríamos aquí. Gracias por todo el esfuerzo y sacrificio de tantos años.

A nuestro@s herman@s por alentarnos a seguir adelante y darnos fuerza en momentos difíciles, así como su alegría.

Agradecimientos

A la Universidad Politécnica Salesiana por brindarnos una educación de excelencia, y forjar profesionales responsables y comprometidos.

Al grupo de Investigación NUNKUI WAKAN por permitirnos formar parte de ellos haciendo posible la ejecución y financiamiento del proyecto.

Al Centro de Investigación y Valoración de Biodiversidad especialmente al Ing. Marco Ibarra quien nos supo brindar su apoyo y guía dentro del laboratorio.

A nuestra amiga y tutora MSc. Laura Huachi, por guiarnos en esta etapa de nuestras vidas, impartir sus conocimientos, por su tiempo, paciencia y amistad incondicional.

A nuestros amigos y compañeros Byron, Diego, Ronald, Francisco, Mario, Ricardo, David y Karina por brindarnos su amistad incondicional y apoyo durante estos años de estudio.

Gracias

Índice

Introducción	1
Capítulo 1	5
Marco conceptual	5
1.1 Suelo	5
1.2 Petróleo.....	5
1.2.1 Clasificación del petróleo	6
1.2.2 Impactos en el suelo por el derrame del petróleo.	7
1.3 Hidrocarburos	7
1.3.1 Hidrocarburos totales policíclicos (TPH's)	8
1.4 Biorremediación	9
1.4.1 Fundamento bioquímico de la biorremediación	11
1.4.2 Biorremediación de petróleo en el suelo.....	12
1.5 Consorcio microbiano	14
1.5.1 Bacterias degradadoras de hidrocarburos.	14
1.5.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
1.5.2 Hongos degradadores de hidrocarburos.....	15
1.5.2.1 <i>Aspergillus niger</i>	15
1.5.2.2 <i>Pleurotus ostreatus</i>	16
1.6 Identificación molecular.....	17
1.7 Marco Legal	18
Capítulo 2.....	20
Metodología	20
2.1.1 Georreferenciación del sitio de muestreo	20
2.1.2 Muestreo de suelo	20
2.1.3 Obtención de petróleo.....	21
2.1.5 Montaje del experimento	21
2.2 Fase de laboratorio	21
2.2.1 Preparación de medios de cultivo usados	22
2.2.2 Diluciones seriadas	22

2.2.3 Aislamiento e identificación de microorganismos.....	22
A. Aislamiento de <i>Aspergillus niger</i>	23
B. Aislamiento de <i>Pleurotus ostreatus</i>	23
2.2.3.2. Identificación de hongos	23
A. Identificación macroscópica	23
B. Identificación microscópica	24
C. Identificación molecular.....	24
2.2.3.3 Aislamiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
2.2.3.4 Identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
A. Identificación macroscópica	27
B. Identificación microscópica	27
2.2.4 Conservación de microorganismos.....	27
A. Conservación de <i>Aspergillus niger</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i>	27
B. Conservación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
2.2.5 Preparación del inóculo	28
2.2.5.1 Preparación de inóculos de hongos	28
2.2.6 Aplicación de agua destilada	29
2.2.7 Aplicación del inóculo	30
A. Aplicación del consorcio.	30
2.2.8 Diseño Experimental.....	30
2.2.8.1 Tratamientos del ensayo.....	31
2.2.9 Análisis fisicoquímicos.....	32
2.2.11 Variables del ensayo	33
2.2.12 Análisis Estadístico.....	34
Capítulo 3.....	35
Resultados y Discusión	35
3.1 Identificación de microorganismos	35
3.1.1 Identificación de <i>Aspergillus niger</i>	35
3.1.2 Identificación de <i>Pleurotus ostreatus</i>	37
3.1.3 Identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
3.1.4 Identificación molecular de <i>Aspergillus niger</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i>	40
3.2 Análisis Estadístico de las Variables de estudio	42

3.2.1 Humedad.....	42
3.2.2 Temperatura.....	44
3.2.3 pH.....	45
3.2.4 Conductividad eléctrica.....	47
3.3 Biodegradación de hidrocarburos TPH`s.....	49
Conclusiones.....	54
Recomendaciones.....	55
Bibliografía.....	56
Anexos.....	65

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación del petróleo según la gravedad API.....	6
Tabla 2. Clasificación según el tenor de azufre.....	7
Tabla 3. Rangos de fracciones de TPH's.....	8
Tabla 4. Algunos ejemplos de bacterias y hongos degradadores de petróleo.....	10
Tabla 5. Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicios.....	18
Tabla 6. Tratamientos del ensayo.....	31
Tabla 7. Parámetros analizados y su metodología.....	33
Tabla 8. Identificación macroscópica y microscópica de <i>Aspergillus niger</i>	35
Tabla 9. Identificación macroscópica y microscópica de <i>Pleurotus ostreatus</i>	37
Tabla 10. Identificación macroscópica y microscópica de <i>Pseudomonas aeruginos</i>	39
Tabla 11. Análisis de secuencias en el programa BLAST	41
Tabla 12. Análisis de varianza para variable humedad y Tukey al 5%.....	42
Tabla 13. Análisis de varianza para variable temperatura y Tukey al 5 %.....	44
Tabla 14. Análisis de varianza para variable pH y Tukey al 5 %.....	45
Tabla 15. Análisis de varianza para variable conductividad eléctrica y Tukey al 5%.....	47
Tabla 16. Análisis degradación TPH's en los tratamientos.....	49
Tabla 17. Análisis degradación HAP's en los tratamientos.....	51

Índice de Figuras

Figura 1. Clasificación química de los hidrocarburos.....	8
Figura 2. Tipos de biorremediación.....	9
Figura 3. Estructuras de los principales glicolípidos.....	15
Figura 4. Ruta catabólica del fenantreno en <i>Aspergillus niger</i>	16
Figura 5. Formación de radicales por el sistema de MnP en presencia de diferentes sustratos.....	17
Figura 6. Diseño experimental DBCA de los 18 tratamientos.....	32

Índice de Anexos

Anexo 1. Tablas de criterios de calidad y remediación (TULAS).....	65
Anexo 2. Fase de campo y análisis físico-químico.....	69
Anexo 3. Metodología análisis TPH´s suelos.....	70
Anexo 4. Montaje del diseño experimental.....	71
Anexo 5. Fase de laboratorio: Aislamiento e identificación de hongos y bacteria.....	72
Anexo 6. Procedimiento de extracción de ADN.....	73
Anexo 7. Metodología análisis físico químicos suelos.....	74
Anexo 8. Identificación molecular de hongos (electroforesis horizontal)	85
Anexo 9. Análisis físicos del suelo (inicio y final del proyecto).....	86
Anexo 10. Análisis de TPH´s.....	88
Anexo 11. Mediciones de las variables.....	110

Resumen

El aprovechamiento de recursos naturales como los hidrocarburos ha generado contaminación e impacto ambiental, en la Amazonía Ecuatoriana. Esta investigación busca evaluar la capacidad biodegradadora de *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa* en suelos contaminados con TPH's (Hidrocarburos Totales de Petróleo) y HAP's (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos).

En este proyecto se muestreó suelo de la ciudad Francisco de Orellana (El Coca), el cual se contaminó con hidrocarburo de grado 28 API, posteriormente se realizaron los análisis fisicoquímicos, cuantificación de TPH's y HAP's; además de aislar e identificar los microorganismos propios del suelo. Con esta caracterización se evaluó la capacidad biodegradadora de *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Se empleó un DBCA (diseño de bloques completos al azar) de 6 tratamientos. Dos veces por semana se aplicó 100 mL de inóculo a una concentración de 10^8 UFC/mL, se midió la temperatura, humedad, pH y conductividad eléctrica; con volteos del suelo. La duración total del experimento fue de tres meses.

Al finalizar la investigación se obtuvieron porcentajes de biodegradación que oscilaron entre 44 % y 10 %, debido al complejo enzimático presente en los microorganismos *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa*, siendo este último el mejor biodegradador para este proyecto, posiblemente por poseer biosurfactantes, monooxigenasas y dioxigenasas que aportaron a la transformación de compuestos recalcitrantes, demostrando que la bioaumentación es una alternativa para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Palabras clave: bioaumentación, monooxigenasas, biosurfactantes, lacasas.

Abstract

The use of natural resources such as hydrocarbons has generated pollution and environmental impact in the Ecuadorian Amazon. This research aims to evaluate the biodegradation capacity of *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* and *Pseudomonas aeruginosa* in soils contaminated with TPH's (Total Petroleum Hydrocarbons) and HAP's (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons).

In this project soil from the city of Francisco de Orellana (El Coca) was sampled, which was contaminated with grade 28 API hydrocarbon, after which the physicochemical analysis, quantification of TPH's and HAP's were carried out; besides isolating and identifying the microorganisms of the soil. With this characterization the biodegradation capacity of *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* and *Pseudomonas aeruginosa* was evaluated.

A DBCA (randomized complete block design) of 6 treatments was used. Twice a week, 100 mL of inoculum was applied at a concentration of 10^8 CFU / mL, temperature, humidity, pH and electrical conductivity were measured; with turn of the ground. The total duration of the experiment was three months.

At the end of the investigation, biodegradation percentages ranging between 44 % and 10 % were obtained, due to the enzymatic complex present in the microorganisms *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* and *Pseudomonas aeruginosa*, the latter being the best biodegradator for this project, possibly due to having biosurfactants, monooxygenases and dioxygenases that contributed to the transformation of recalcitrant compounds, demonstrating that bioaugmentation is an alternative for the recovery of soils contaminated with hydrocarbons.

Key words: bioaugmentation, monooxygenases, biosurfactants, laccases.

Introducción

La contaminación de los suelos por hidrocarburos es un problema de carácter mundial y local, resultado de las actividades extractivas humanas, operacionales e industriales en la obtención de petróleo; ocasionando acumulación de sustancias recalcitrantes, pérdida de microbiota y daños ambientales.

Los derrames de hidrocarburos en el suelo de la Amazonía del Ecuador son difícilmente reversibles por su mezcla de sustancias químicas (compuestos xenobioticos) conocidos como (TPH's) mismos que alteran el ecosistema por su toxicidad (Enríquez, 2012). Las técnicas fisicoquímicas de remediación empleadas no alcanzan a cubrir las zonas devastadas; llevando a una larga duración y altos costos (Contreras, 2014).

Los tratamientos fisicoquímicos utilizados para destruir, separar y contener el contaminante, han dado como resultado daños ecológicos y una recuperación incompleta (Vallejo, 2015). Una alternativa de tratamiento es la biorremediación cuyo fin es utilizar el potencial metabólico de la micro biota autóctona y exógena, los cuales transforman los contaminantes disminuyendo su toxicidad o eliminando los residuos presentes en una matriz sólida o líquida y recuperando la matriz original (Ferreira Do Nascimento, Santos Oliveira y Pessoa De Franca, 2013) (Contreras, 2014).

La biorremediación es una tecnología basada en la biodegradación o transformación microbiana de contaminantes para eliminarlos o transformarlos en otros menos peligrosos. Idealmente los productos se convierten en agua, sales inorgánicas, dióxido de carbono y/o biomasa. Para potenciar la biodegradación se utiliza enzimas,

estimulantes de crecimiento, bacterias, hongos o plantas para degradar, transformar, secuestrar o movilizar contaminantes orgánicos, inorgánicos o metales en el suelo, agua o aire (Romero, 2013). Existen especies de microorganismos capaces de degradar componentes del petróleo. Los componentes orgánicos serán utilizados por los microorganismos como fuente de energía y carbono, transformando al contaminante por las diferentes vías metabólicas o mecanismos aerobios, anaerobios, fermentación, co-metabolismo y dehalogenización reductiva (Figuroa, 2005).

Se evidencia en estudios anteriores que los microorganismos utilizados en este proyecto son capaces de biorremediar ambientes contaminados con hidrocarburos, pesticidas y metales pesados obteniendo buenos resultados (Enríquez, 2012) (Ferreira Do Nascimento, Santos Oliveira y Pessoa De Franca, 2013) (Mendoza, 2014).

Para el presente proyecto se evaluó *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa* porque cada uno de ellos tienen mecanismos que favorecen la degradación de TPH's y HAP's.

El hongo *Aspergillus niger* pertenece a la familia *moniliaceae*, orden *moniliale*. Su metabolismo se destaca por el desdoblamiento del almidón, degradación de compuestos carbonados y nitrogenados del suelo. Se ha utilizado sus micotoxinas para la producción de ácidos orgánicos, enzimas y también se ha visto involucrado como biorregulador de plagas, descomponedor de la materia vegetal y es causante de enfermedades en las plantas, animales y humanos (Lezcano, Martínez y Alonso, 2015). Las enzimas citocromo monoxigenasas P450 permiten la oxidación catalítica de (HAP's) y (TPH's), degradando desde un 54 % hasta 73 % de HAP's y un 100 % de fracciones aromáticas (Araujo y otros, 2016).

Pleurotus ostreatus es un Basidiomiceto categorizado como hongo de pudrición blanca (Salmones y Mata, 2015), posee gran cantidad de proteínas, fibra, carbohidratos, vitaminas y minerales además de propiedades antimicrobianas, antivirales, antiinflamatorias y antioxidantes (Chaves, Libardi, Borges y Wisbeck, 2014). Este basidiomiceto presenta una alta capacidad de biodegradación, sorción y biorremediación dado que posee enzimas como lacasas, manganeso peroxidasa (MnP) y lignina peroxidasa (LiP) (Bhattacharya, Das y Palaniswamy, 2016) (Válková, 2017).

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa, oblicua, encontrada en el suelo, en aguas prístinas y contaminadas; es productora de biosurfactantes como los ramnolípidos involucrados en procesos de remoción de hidrocarburos (Soberón, 2012). Esta especie se ha caracterizado por la degradación de naftaleno y fenantreno utilizados como única fuente de carbono y nitrógeno, tiene una alta capacidad oxidativa, es muy tolerante a ambientes alcalinos y de poca cantidad de nutrientes (Mendoza, 2014).

Por lo tanto, la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando microorganismos como *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa* es una técnica que podría favorecer la recuperación del suelo, cumpliendo con el artículo 72 del plan del buen vivir: “La naturaleza tiene derecho a la restauración. Esta será independiente de la obligación que tiene el Estado. En los casos de impactos ambiental grave o permanente, incluidos los ocasionados por la explotación de los recursos naturales no renovables, el Estado establecerá los mecanismos más eficientes para alcanzar la restauración, y adoptará las medidas adecuadas para eliminar o mitigar las consecuencias ambientales nocivas.” (Constitución de la República del Ecuador, 2016)

El objetivo general de este proyecto es evaluar la eficacia de *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa* en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Los objetivos específicos son analizar parámetros fisicoquímicos y contenido de TPH's y HAP's en muestras de suelo contaminadas con petróleo al inicio y final del proyecto; aislar los microorganismos *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa* de la muestra de suelo; y determinar el mejor tratamiento para la degradación de TPH's.

La fase de campo se realizó en la ciudad de Francisco de Orellana "El Coca". Los análisis se realizaron en tres laboratorios: El Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana (UPS), el laboratorio de Suelos de la UPS sede Cayambe y el laboratorio de GRUNTEC Environmental Services.

El diseño experimental consistió en un DBCA construido con 6 tratamientos y 3 repeticiones obteniéndose un total de 18 unidades experimentales. T0 (suelo); T1 (suelo + hidrocarburo); T2 (suelo + hidrocarburo+ *Aspergillus niger*); T3 (suelo + hidrocarburo + *Pleurotus ostreatus*); T4 (suelo + hidrocarburo + *Pseudomonas aeruginosa*); T5 (suelo + hidrocarburo+ *Aspergillus niger* + *Pleurotus ostreatus*+ *Pseudomonas aeruginosa*). Las variables evaluadas fueron Temperatura, pH, Humedad, Conductividad eléctrica, Concentración de TPH's y HAP's al inicio y al final del ensayo.

El análisis estadístico se realizó por análisis de varianza (ANOVA) con Tukey al 5 % mediante el programa InfoStat.

Esta investigación busca aumentar el conocimiento de técnicas de biorremediación para la recuperación de suelos.

Capítulo 1

Marco conceptual

1.1 Suelo

Es un medio formado por consecuencia de acciones combinadas del clima, factores bióticos, materia orgánica, y del tiempo (Riesco, 2012). El factor suelo se ha constituido por rocas consolidadas en donde se producen reacciones químicas dando como resultado: agua, nutrientes y oxígeno mismos que son utilizados para el desarrollo de la vida. Es un sistema dinámico formado por capas horizontales con propiedades diferentes en cuanto a textura, estructura, color, composición química, mineralógica y biológica (Alcazar, 2012).

1.2 Petróleo

Es un derivado de una mezcla de carbono e hidrógeno formado por la descomposición de materiales orgánicos. Es un líquido viscoso y oscuro refinado por destilación separado en fracciones hasta obtener sustancias y líquidos como la gasolina, vaselina, gas licuado de petróleo, etc. Se sostiene como teoría que las bacterias convirtieron las grasas de la vida marina en ácidos grasos, mismos que se transformaron en material asfáltico denominado kerógeno y este a su vez por medio del calor, la presión y agentes catalíticos fue transformado en petróleo y gas (Fieser y Fieser, 1985) (Borgna, Cosimo y Fígoli, 2001).

El petróleo está formado por moléculas de hidrocarburos: compuestos cíclicos o lineales con enlaces simples o dobles y cadenas de carbono cortas o largas entre los principales se tiene a las parafinas, olefinas, naftenos y aromáticos; también está formado por impurezas como el azufre y otros metales. La composición elemental

del petróleo es: Carbono desde el 83 % al 87 %, Hidrógeno desde el 10 % al 16 %, Azufre menor al 6 %, Oxígeno menor al 1 % y metales menores al 0.03 % (Iglesias, 2003) (Pazmiño, 2013).

1.2.1 Clasificación del petróleo

Al petróleo en su estado natural (crudo) se lo puede clasificar de varias maneras; por su referencia de mercado (origen), su contenido de azufre y según su grado API (American Petroleum Institute) o densidad relativa, que se basa en la comparación de la densidad del petróleo con la del agua a una misma temperatura. Mientras mayor sea la gravedad API, el petróleo se conoce como liviano, con mayor consumo en el mercado y mayor precio (Nava, 2014) (INEN, 2015).

Tabla 1.

Clasificación del petróleo según la gravedad API

TIPO DE CRUDO	Escala API	DENSIDAD (kg/m ³)	DESCRIPCIÓN
Liviano	> 31.1	< 870	Alta concentración de hidrocarburos de bajo peso molecular
Medio	22.3 – 31.1	920 - 870	Concentración media de hidrocarburos de bajo peso molecular
Pesado	10.0 – 22.3	1000 - 920	Gran concentración de hidrocarburos de mediano peso molecular
Extra pesados	< 10	> 1000	Baja concentración de hidrocarburos con mayor peso molecular

Nota: Adaptado de (Barrios, 2013) (Nava, 2014) por los autores, 2018.

Los petróleos livianos son más caros pues requieren de mayores condiciones de planta y elaboración de combustibles para obtener un derivado de buena calidad.

Tabla 2.

Clasificación según el tenor de azufre

Petróleo dulce	Menos del 0.5% S
Petróleo medio	Entre 0.5 y 2% S
Petróleo agrio	Más del 2% S

Nota: Adaptado de Barrios (2013) por los autores, 2018.

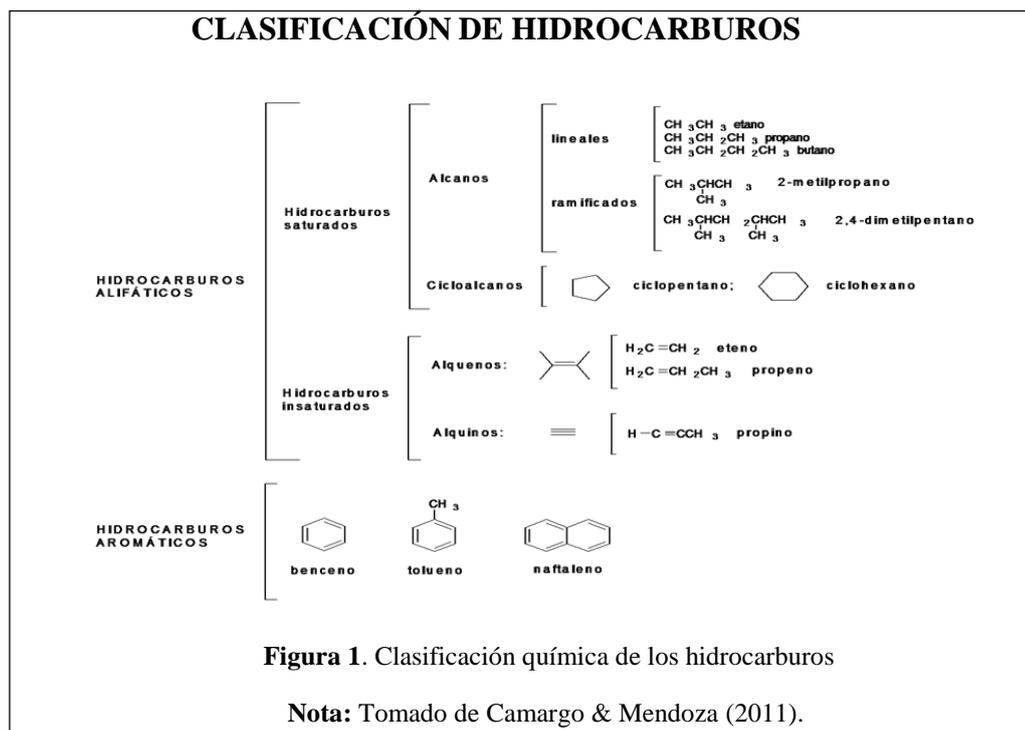
La presencia del Azufre (S) indica si el crudo es corrosivo o no. Esto se determina por la cantidad de azufre, siendo los más corrosivos los agrios (Barrios, 2013).

1.2.2 Impactos en el suelo por el derrame del petróleo.

El suelo al estar contaminado de petróleo produce la adición descontrolada de carbono perdiendo la fertilidad del suelo al disminuir las concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio. Así también es el responsable de la muerte de la microbiota autóctona aerobia debido a la compactación entre partículas que no le permite entrar y salir al oxígeno. Al obtener las sobrecargas de moléculas se ve afectado el pH (potencial de hidrógeno) disminuyéndose a niveles de acidez de entre 5 a 4 lo que ha originado problemas de suelos inertes (Macarulla & Goñi, 2002).

1.3 Hidrocarburos

Son compuestos orgánicos provenientes de la combinación de átomos de hidrógeno monovalentes con átomos de carbono tetravalentes. Los hidrocarburos contienen además oxígeno, nitrógeno y azufre que forman compuestos como disulfuros, polisulfuros ácidos nafténicos, etc; que pueden ser explosivos y presentar alta toxicidad (Minería, 2010). Los hidrocarburos se pueden clasificar según su estructura de la cadena carbonada y sus enlaces (Macarulla & Goñi, 2002).



1.3.1 Hidrocarburos totales policíclicos (TPH's)

Los TPH's se conforman por compuestos de carbono e hidrógeno insolubles o poco solubles en el agua con cadenas de 5 a 36 carbonos con propiedades químicas similares entre sí, agrupándolos por su densidad, punto de ebullición, presión de vapor, solubilidad y polaridad. Estos compuestos por su estructura son no polares debido a la diferencia de electronegatividad entre los enlaces carbono-hidrógeno que es mínima (Ron, 2012). Los rangos de fracciones de TPH's se tienen en la tabla 3.

Tabla 3.

Rangos de fracciones de TPH's

Fracción TPH	Constituyente
TPH-GRO (TPH en rango de gasolina)	C ₅ -C ₁₀
TPH-DRO (TPH en rango de diesel)	C ₁₀ -C ₂₅
TPH-ORO (TPH en rango de aceites lubricantes)	C ₂₅ -C ₃₆

Nota: Adaptado de Ron, (2012) por los autores, 2018.

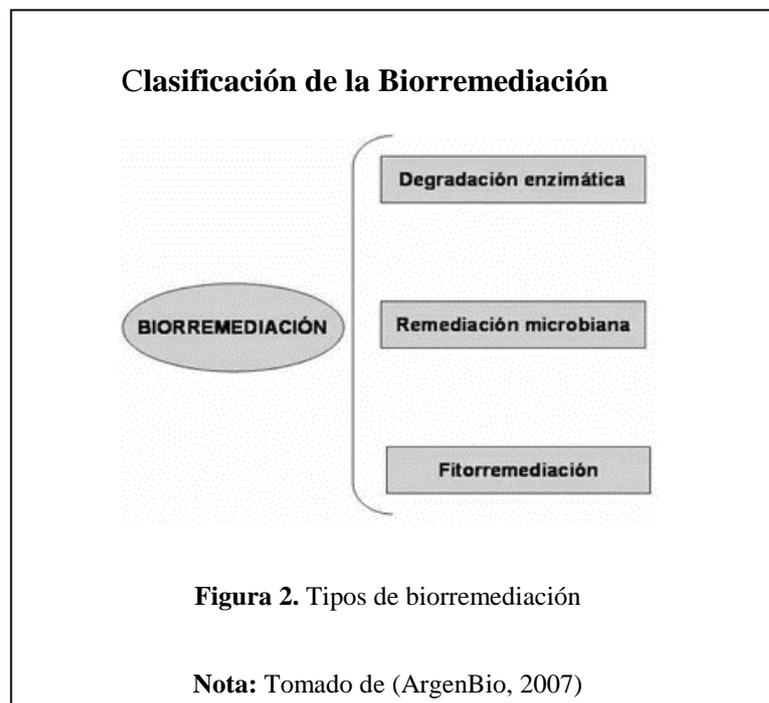
Las fracciones de hidrocarburos de petróleo se comportan de manera similar al suelo o al agua, conteniendo productos individuales como el hexano, benceno, tolueno,

naftalina, xilenos, fluoreno, aceites minerales. Su origen puede ser natural o antrópica entrando en el ambiente a raíz de fugas, accidentes y derrames industriales. La contaminación por TPH's surge cuando la cantidad de hidrocarburos es mayor a la capacidad de degradación de los microorganismos, responsables de oxidar y mineralizar los TPH's a sustancias inocuas (Castro, 2007).

Las fracciones de TPH's que no son degradadas se adhieren a partículas del suelo o sedimentos permaneciendo por largo tiempo afectando las cantidades y características de la naturaleza del suelo llamándolo suelo contaminado (Sepúlveda & Velasco, 2002).

1.4 Biorremediación

Consiste en el uso de organismos vivos, sus componentes celulares y enzimas libres, para obtener una transformación parcial o mineralización de los compuestos xenobióticos o recalcitrantes. Esta estrategia es más económica que lo métodos fisicoquímicos, favorece al ambiente y fácilmente aplicable in situ (Castellano & Rache, 2013).



a) Degradación enzimática

Las enzimas se utilizan en el lugar contaminado con el objetivo de degradar sustancias perjudiciales. Las enzimas son resultados naturales de bacterias, hongos y plantas o a la vez de organismos genéticamente modificados que son comercializadas. Las más utilizadas son lipasas (que degradan lípidos), celulosas, proteinasas y amilasas que degradan celulosa, proteínas y almidón, respectivamente. Además, peroxidasas capaces de degradar compuestos tóxicos, como la degradación de aminas aromáticas y fenoles (ArgenBio, 2007).

b) Remediación microbiana

Utiliza microorganismos en el lugar contaminado, estos pueden ser autóctonos presentes en la zona de estudio o exógenos provenientes de diferentes ecosistemas, que pueden ser añadidos o inoculados. La biorremediación se realiza cuando los microorganismos transforman moléculas orgánicas en menos tóxicas y más pequeñas (ArgenBio, 2007). Algunos microorganismos que poseen esta capacidad son los que se aprovechan para este proceso, así se tiene la tabla 4.

Tabla 4.

Algunos ejemplos de bacterias y hongos degradadores de petróleo

Bacterias		Hongos	
<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Paecilomyces</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Cephalosporium</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Mycobacterium</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizopus</i>

Nota: Adaptado de Ron (2012) por los autores, 2018.

Existen bacterias y hongos que degradan con facilidad el hidrocarburo y sus derivados, benceno, tolueno, pesticidas, herbicidas, éteres, entre otros. Los

metales pesados no son biodegradables, pero las bacterias pueden concentrarlos y aislarlos para que sean eliminados más fácilmente (ArgenBio, 2007).

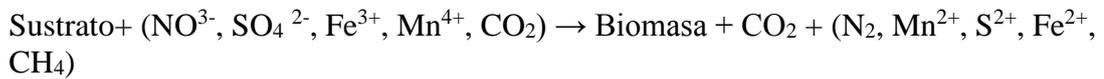
c) Remediación con plantas (fitorremediación)

La fitorremediación para limpiar ambientes contaminados usa plantas, aunque se la está perfeccionando, es una alternativa muy interesante, debido a la capacidad de algunas especies vegetales de absorber, acumular y/o tolerar concentraciones de contaminantes como metales pesados, compuestos orgánicos y radioactivos superiores a los límites permisibles (ArgenBio, 2007).

1.4.1 Fundamento bioquímico de la biorremediación

Está basada en la cadena respiratoria con reacciones de óxido-reducción (obtención de energía). La cadena la inicia un sustrato orgánico (compuestos hidrocarburos) que es externo a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia (Maroto, 2012).

Los aceptores utilizados por los microorganismos comúnmente son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio.

Degradación aerobia:**Degradación anaerobia:**

Fórmula 1. Fundamento bioquímico de la biorremediación

Fuente: (Maroto, 2012)

1.4.2 Biorremediación de petróleo en el suelo.

El factor suelo y la carga microbiana nativa son los que determinan la biodegradación de hidrocarburos. Las características para una buena biorremediación son:

- **La necesidad de nutrientes:** El metabolismo de los microorganismos está orientado a la reproducción de los mismos y éstos requieren que los nutrientes se encuentren accesibles para su asimilación y sintetización. Los nutrientes requeridos principalmente son el fósforo y el nitrógeno. Por lo general el suelo tiene una buena concentración de nutrientes, en todo caso, si estos no se encontrasen en el rango óptimo se puede adicionar externamente al medio. El rango normal de C:N:P habitualmente es 100:10:1.
- **El pH del suelo:** Este influye en gran manera en la actividad de los microorganismos, siendo así que el crecimiento de la mayoría de los microorganismos está en un intervalo entre pH 6 y 8. De igual manera afecta directamente la solubilidad del fósforo y el transporte de metales pesados en

el suelo. El pH del suelo se puede acidificar o alcalinizar adicionando azufre o compuestos del azufre.

- **La temperatura:** Las bacterias crecen comúnmente en rangos de temperatura bastante reducidos, entre 15 y 45 °C (condiciones mesófilas), decreciendo la biodegradación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40 °C e inhibiéndose a inferiores a 0 °C.
- **La humedad:** Los microorganismos requieren de condiciones de humedad para su crecimiento, mismas que van desde 90 % hasta 99 % (UGR, 2005). El agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte para que los compuestos orgánicos y nutrientes sean movilizados hasta el interior de las células. Un exceso de humedad inhibirá el crecimiento bacteriano al reducir la concentración de oxígeno en el suelo.
- **La estructura química del hidrocarburo:** La inherente biodegradabilidad de un hidrocarburo depende, en gran medida, de su estructura molecular, siendo los parámetros que más van a afectar la halogenación, la existencia de ramificaciones, la baja solubilidad en el agua y la diferente carga atómica (Maroto, 2012).
- **La conductividad eléctrica:** Esta varía entre 0.17 a 0.5 dS/m lo que indica el aumento o disminución de salinidad en suelos contaminados con hidrocarburos y parámetros para el crecimiento bacteriano (Montenegro, 2007).

1.5 Consorcio microbiano

Son sistemas naturales de microorganismos que se encuentran coexistiendo y cooperando entre ellos, actuando como una comunidad y beneficiándose de la actividad catalítica de los demás (Moronta, 2015).

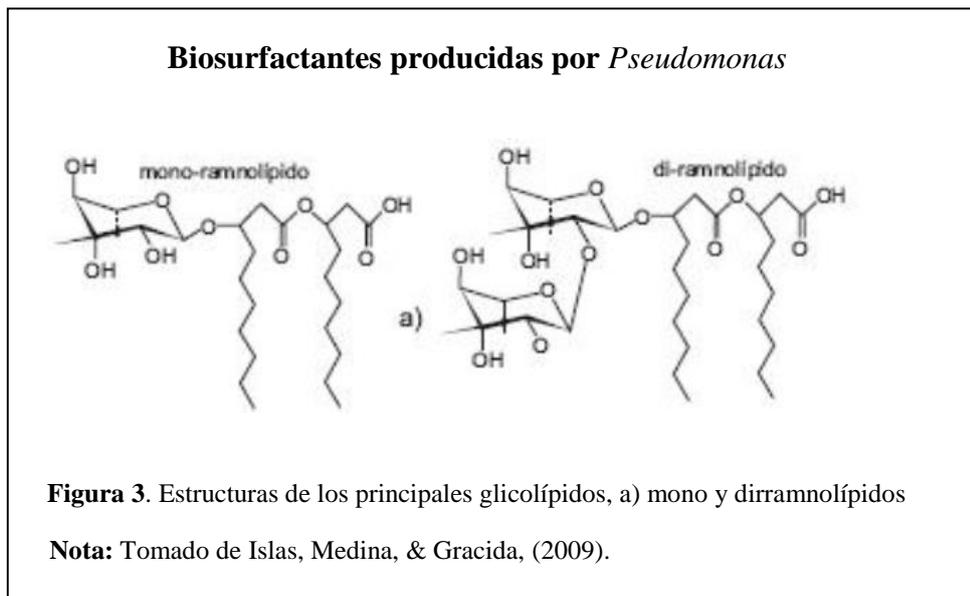
1.5.1 Bacterias degradadoras de hidrocarburos.

Estos microorganismos son un componente esencial en la biorremediación de suelos por su alta abundancia, alta diversidad y multiplicidad de funciones metabólicas como: la degradación de compuestos xenobióticos, mineralización de la materia orgánica, la realización de ciclos biogeoquímico y la transformación de compuestos de cadena larga (AgenciaUN, 2012).

1.5.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Son gram negativas, obicuas capaces de metabolizar naftaleno y asfaltenos. Productoras de biosurfactantes como los ramnolípidos en la fase estacionaria de su crecimiento, remueve derivados de petróleo como el n-hexadecano, compuestos aromáticos y mineralización de compuestos alifáticos en remoción de aceites y productos relacionados (López, y otros, 2006).

Los ramnolípidos están conformados por un glucósido de β -hidroxidecanoil- β - hidroxidecanoato y dos moléculas de ramnosa, cuya estructura se ha denominado R2; en presencia de n-alcenos produce mono-ramnolípidos correspondiente a L- α -ramnopiranosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato, denominada R1 (Fig 3). La vía metabólica está relacionada a la ruta de ácidos grasos y moléculas que contienen L-ramnosa (Islas, Medina, & Gracida, 2009).

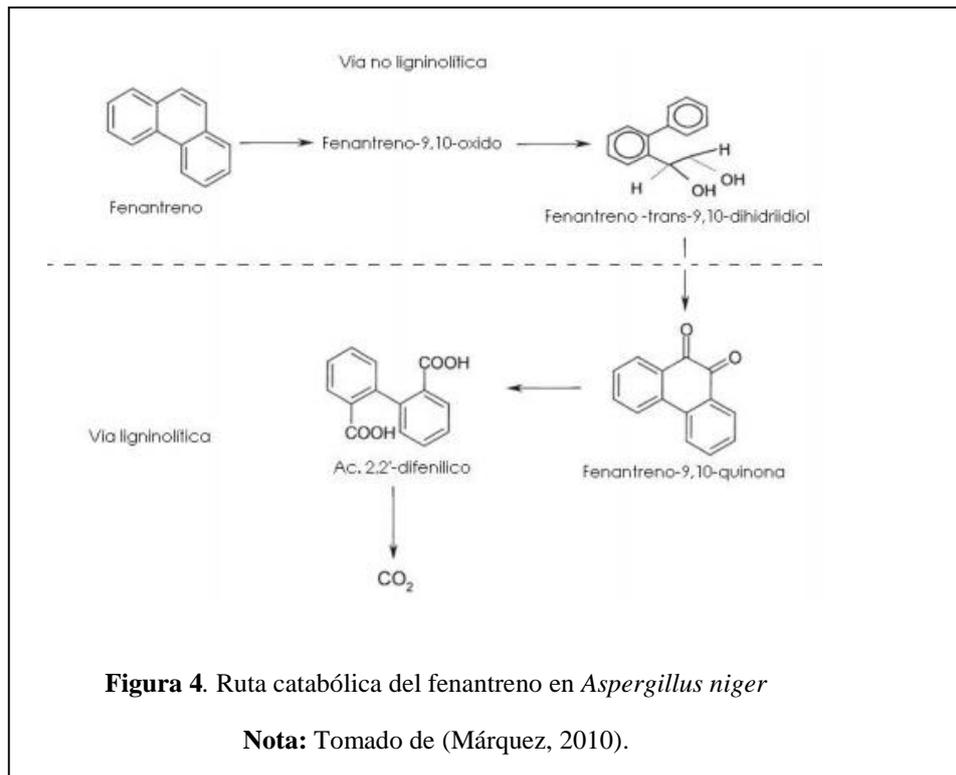


1.5.2 Hongos degradadores de hidrocarburos.

1.5.2.1 *Aspergillus niger*

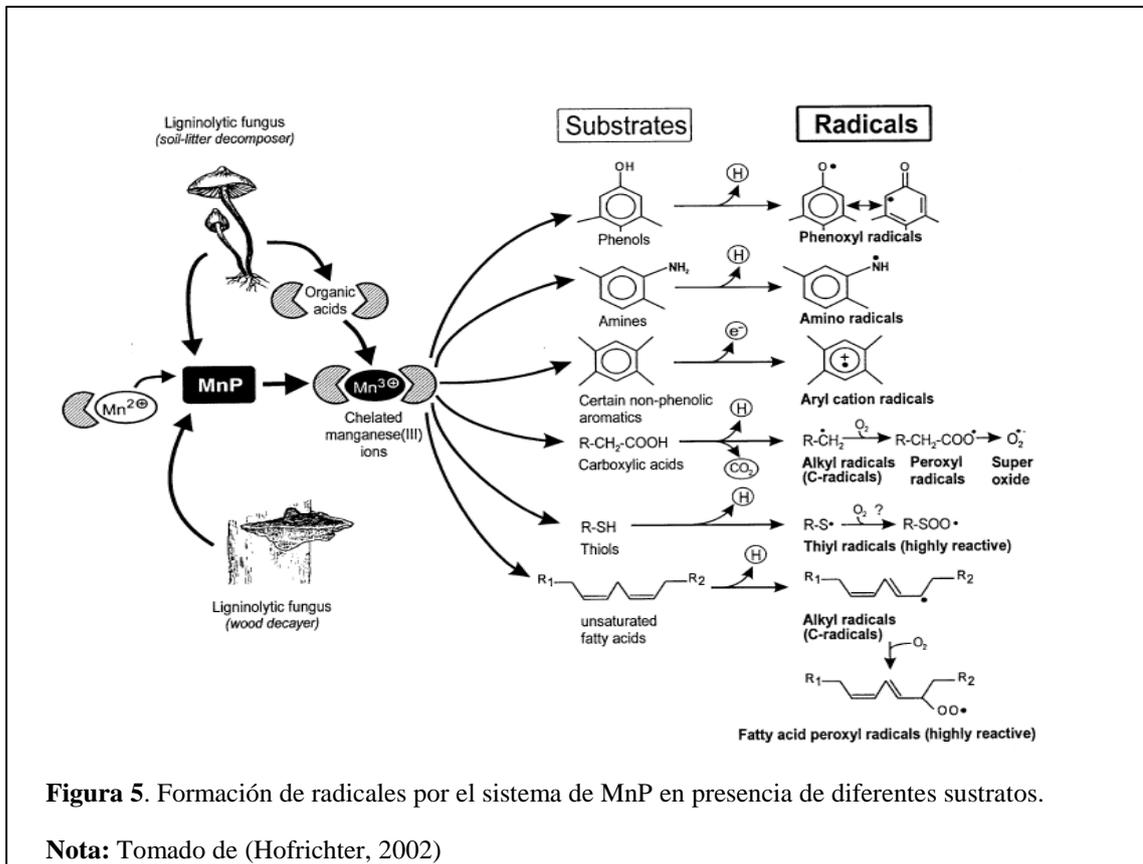
Hongo filamentoso perteneciente al grupo de los aspergilos negros, morfológicamente llega a tener un diámetro de 4-5 cm en 7 días formando una capa blanca o amarilla con conidioforos color café oscuro a negro (Flóres, Cadavid, & Sáez, 2002). Posee la habilidad de producir metabolitos tóxicos, importante para el proceso de fermentación y producción de ácidos orgánicos o enzimas (Márquez, 2010).

Entre las enzimas que posee están las monooxigenasas y la MnP (manganeso peroxidasa) son las que trabajan en el proceso de transformación de compuestos catalizadas por el citocromo P450; enzima que interviene en el metabolismo de compuestos xenobióticos como en la biosíntesis de metabolitos secundarios, entre ellas las micotoxinas (Márquez, 2010).



1.5.2.2 *Pleurotus ostreatus*

Es un basidiomiceto de pudrición blanca cuyo sistema ligninolítico consiste en lacasas y manganeso peroxidasa, tiene la capacidad de desdoblar la lignina de la madera y más sustancias lignolíticas. La expresión de sus enzimas se obtiene cuando tiene deficiencia de nutrientes y altas concentraciones de oxígeno. Su capacidad para crecer en el suelo y competir con la microflora nativa, así como su excelente desempeño en pruebas de biodegradación, hicieron de este hongo sea un modelo para la degradación de los xenobióticos. Los reguladores como el cobre, cadmio, mercurio y plomo resultado de actividades humanas y los metales pesados se han tomado como fuente de energía con la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y bifenilos policlorados (Petro & Jiri, 2006) (Rosales, 2008).



1.6 Identificación molecular

El método más confiable para la identificación de microorganismos se basa en el análisis del material genético (ADN). Se basa en la extracción de ADN rompiendo las estructuras de la membrana y pared de la célula. Luego se utiliza la técnica denominada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permite la amplificación de un fragmento de ADN específico que se encuentra en el ADN molde. El segmento amplificado debe ser el segmento ITS (Internal Transcribe Spacers), que pertenece al grupo fúngico. Posteriormente, el fragmento amplificado por la PCR o amplicon, es secuenciado para obtener el orden de las bases para determinar género y la especie con la bioinformática (Herveg, 2006).

1.7 Marco Legal

El presente proyecto se llevó a cabo siguiendo la reglamentación establecida por el RAHOE y TULSMA, de manera que se buscó alcanzar los límites permisibles de calidad del suelo y de remediación establecidos por dichas reglamentaciones.

Tabla 5.

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

Parámetro	Expresado en	Unidad	Uso Agrícola	Uso Industrial	Ecosistemas sensibles
Hidrocarburos totales	TPH	mg/kg	<2500	<4000	<1000
HAP	C	mg/kg	<2	<5	<1
Cadmio	Cd	mg/kg	<2	<10	<1
Níquel	Ni	mg/kg	<50	<100	<40
Plomo	Pb	mg/kg	<100	<500	<80

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

Fuente: Tabla 6 del Reglamento Ambiental para las operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador.

(RAOHE 1215, 2001)

Según el Texto Unificado de Legislación Secundaria, Medio Ambiente (TULSMA), Libro XI, Anexo 2: Norma de Calidad Ambiental del Recurso Suelo y Criterios de Remediación para Suelos Contaminados.

4.1.3 Suelos Contaminados

Art. 4.1.3.1 Los causantes por acción u omisión de contaminación al recurso suelo, a causa de derrames, vertidos, fugas, almacenamiento o abandono de productos o desechos peligrosos, infecciosos o hidrocarburíferos, deberán proceder a la remediación de la zona afectada, considerando para el efecto los criterios de remediación de suelos contaminados que se encuentran en la presente norma.

Art. 4.1.3.2 La entidad ambiental de control exigirá al causante la remediación del sitio contaminado y el monitoreo de las acciones de remediación, hasta alcanzar los objetivos o valores de remediación establecidos en la presente norma.

Art. 4.1.3.7 Independiente del tratamiento que el regulado adopte, los suelos contaminados deberán alcanzar los niveles de concentración establecidos en los criterios de remediación de suelos establecidos (Ver anexo 1) en la presente Norma. Los valores serán aplicados de acuerdo al uso de suelo donde se sitúa el área contaminada.

Art. 4.2.2 Criterios de Remediación o Restauración del Suelo

Los criterios de Remediación o Restauración se establecen de acuerdo al uso que del suelo (agrícola, comercial, residencial e industrial) (Ver anexo 1). Tienen el propósito de establecer los niveles máximos de concentración de contaminantes de un suelo en proceso de remediación o restauración.

Capítulo 2

Metodología

La presente investigación se la desarrolló en dos fases: fase de campo y fase de laboratorio. La primera fase se llevó a cabo en la ciudad Francisco de Orellana (El Coca), en donde se obtuvo muestras del suelo. La segunda fase se la realizó en tres laboratorios: El Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana (UPS), el laboratorio de Suelos de la UPS sede Cayambe y el laboratorio de GRUNTEC Enviromental Services.

El ensayo se llevó a cabo en condiciones ex situ, con volteos semanales para aportar oxígeno y darle condiciones aerobias a los tratamientos.

2.1 Fase de campo

2.1.1 Georreferenciación del sitio de muestreo

Se realizó en la ciudad Francisco de Orellana (El Coca), a una altura de 1057 m.s.n.m donde se muestrearon 20 puntos con la ayuda de un GPS marca GARMIN modelo eTrex 10 y se expresó en coordenadas UTM (Ver anexo 2).

2.1.2 Muestreo de suelo

Se utilizó la técnica tres bolillos en toda el área del terreno hasta obtener 20 puntos. En cada punto se realizó excavaciones de 25 cm de largo, 25 cm de ancho y 40 cm de profundidad, tomando submuestras de 2 kg, mismas que fueron colocadas en un saquillo de polietileno (Ver anexo 2). Se mezcló uniformemente para tomar una muestra de 1 kg, que se colocó en una funda ziploc y se etiquetó (lugar, fecha, tipo de muestra, responsable y número de muestra).

La muestra fue transportada en cooler hasta el laboratorio de Análisis de Suelo de la Universidad Politécnica Salesiana centro de apoyo Cayambe para los análisis fisicoquímicos.

2.1.3 Obtención de petróleo

Se obtuvo 3.5 L de crudo de 28 ° API de la refinería de Esmeraldas por facilidad de permisos ambientales.

2.1.4 Contaminación de suelo con hidrocarburos

Del suelo muestreado se separó 6 kg para el tratamiento blanco y al suelo restante (33 kg) se agregó 3.5 L de crudo hasta obtener una mezcla homogénea. Se tomó una muestra de 1 kg para ser trasladada hacia el laboratorio de Gruntec Environmental Services donde se realizaron los respectivos análisis de TPHs y HAPs, por el método EPA 8015 y por el método EPA 8270 respectivamente (Ver anexo 3).

2.1.5 Montaje del experimento

Se prepararon 16 cajas, a las cuales se cubrió la parte interna con plástico negro, realizando pequeños orificios al fondo de esta para el drenaje y etiquetándolas respectivamente (Ver anexo 4).

Una vez lista las cajas se tomó la mezcla suelo con hidrocarburo; se pesó y se colocó 2.1 kg en cada caja.

2.2 Fase de laboratorio

Las técnicas de aislamiento, purificación, identificación y reproducción de los microorganismos *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa*

se realizaron en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Quito.

2.2.1 Preparación de medios de cultivo usados

Se utilizaron los medios PDA (Agar papa dextrosa) y Sabouraud para crecimiento de hongos, TSA (Tripteina Soya Agar) y TSB (Tripteina Soya Caldo) para crecimiento de bacterias; el medio selectivo Agar Cetrimida para el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*. Se prepararon según las especificaciones del fabricante.

2.2.2 Diluciones seriadas

Se colocaron 10 g de la mezcla suelo con hidrocarburo obtenido anteriormente en un matraz de 250 mL, se adicionó 90 mL de agua destilada; la mezcla se llevó a incubación en un rango de temperatura de 30 a 35 °C y agitación de 150 rpm durante 30 min, obteniendo así la solución madre.

Con una micropipeta se tomó 1 mL de la solución madre y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 9 mL de agua destilada, posteriormente se llevó a vórtex por 5 segundos para obtener la dilución 10^{-1} , de esta dilución se tomó 1 mL y se transfirió a un nuevo tubo que contenía 9 mL de agua destilada estéril para obtener la dilución 10^{-2} (Arrieta, y otros, 2012), estos pasos fueron repetidos hasta obtener la dilución 10^{-6} para hongos y dilución 10^{-10} para bacterias (Arana, Orruño, & Barcina, 2010) (Ver anexo 5).

2.2.3 Aislamiento e identificación de microorganismos.

A. Aislamiento de *Aspergillus niger*.

Se utilizó el protocolo descrito por Moya, García, Avilés, Andújar y Nuñez (2014). Se tomó 100 µL de cada una de las diluciones seriadas, depositándolas en cajas Petri que contenían medio PDA y Sabouraud, se utilizó la técnica de siembra directa con un asa de Drigalski estéril esparciendo la muestra en toda la placa. Se sembraron las diluciones por triplicado; posteriormente se incubaron las placas durante 7 días a 25 °C.

También se realizó la técnica de siembra directa de suelo que consistió en introducir 0.4 g de suelo fresco en cajas Petri con medio de cultivo PDA, por triplicado. Se llevó a incubación durante 7 días a 25 °C para observar el crecimiento fúngico (Domínguez, Vázquez, Reyes, Arzaluz, & Martínez, 2013).

B. Aislamiento de *Pleurotus ostreatus*.

Se utilizó cepas conservadas de proyectos anteriores y se procedió a realizar resiembras para activar y mantener la cepa. Se tomaron pedazos de 0.5 cm de largo y ancho de las cajas Petri que presentaron masivo crecimiento micelial, estos fueron colocados en el centro de nuevas cajas Petri con medio de cultivo PDA, y fueron incubadas a 25 °C por 7 días en ausencia de luz (Domínguez, Vázquez, Reyes, Arzaluz, & Martínez, 2013).

2.2.3.2. Identificación de hongos

A. Identificación macroscópica

Se utilizó la técnica de Martínez (2014), donde se observaron las características del micelio como el color del haz y el envés en las cajas Petri y se tomaron medidas en cm del crecimiento hasta su maduración. Posteriormente, se tomaron muestras de

micelios de cada hongo por medio de una cinta scotch aproximadamente de 0.5 cm de largo y ancho y, se las fijó en un portaobjetos. Usando un estereoscopio se determinó el color, forma y consistencia, se tomaron fotografías y se compararon con especies registradas en el libro *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (Pérez, 2006).

B. Identificación microscópica

Se utilizó la técnica de Araujo y otros (2016) en donde la metodología de fijación es similar a lo descrito en el parrafo anterior con la adición de una gota de azul de lactofenol para luego ser observado en el microscopio para el reconocimiento de estructuras según galerías fotográficas de Fernandez & Henao (2007); Sánchez & Royse (2001).

C. Identificación molecular

- Extracción de ADN

Se utilizó el protocolo de Paredes y Yugsi (2016). Se tomaron muestras de 50 mg de cada hongo en tubos eppendorf de 2 μ L, se añadió 500 μ L de buffer de lisis (200 mM Tris HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS), se homogenizó la solución con un agitador de vidrio y un vórtex por 1 minuto; luego se incubó en el termo bloque por 20 minutos a 37 °C. Después de este tiempo se agregó 500 μ L de fenolcloroformo a 4 °C en proporción 1:1 y se homogenizó con vórtex por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos separando la fracción proteica suspendida en el fenol del ADN suspendido en el cloroformo (Garzon, 2013).

El sobrenadante se transfirió a un tubo de 1.5 mL añadiendo 400 μ L de cloroformo a -20 °C, se mezcló en un tiempo de 1 minuto por inversión y se centrifugó a 13000

rpm por 5 minutos. El sobrenadante formado se tomó y se incubó en un nuevo tubo que contenía 4 µL de ARNasa (10 mg/ mL) por 30 minutos a 37 °C. Se agregó 500 µL de isopropanol a 4 °C, se mezcló en un tiempo de 1 minuto por inversión y se incubó a -20 °C por 15 minutos. Al terminar el tiempo de incubación se centrifugó a 5 minutos a 13000 rpm. Se conservó el pellet y se desechó el sobrenadante, para el lavado del pellet se añadió 500 µL de etanol a 70 % a -20 °C y se mezcló en un tiempo de 1 minuto por inversión. Finalmente se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm, se desechó el sobrenadante y el pellet seco se resuspendió en 50 µL de TE y se almacenó a -20 °C (Vanegas, Gutiérrez, & Marín, 2013).

Se utilizó electroforesis horizontal para determinar la presencia o ausencia de ADN (Ver anexo 6). En el gel de agarosa al 1 % se añadió 5 µL de Syber safe por cada 50 mL de TBE 1X. Cada muestra fue preparada con 5 µL de ADN, 5 µL de Tampón de carga Blue Juice 2X y fueron corridas a 90 V por 40 minutos en la cámara de electroforesis Labnet. Después de este tiempo el gel fue revelado y fotografiado en un foto documentador Bio-imaging systems (Paredes & Yugsi, 2016).

- **Amplificación con regiones ITS**

Para este paso se utilizaron primers para la región del rARN ITS 1 (5'CCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional. Consistió en tomar tubos de 0.2 mL en los que se colocaron 12.5 µL de Master Mix Go Taq polimerasa marca *Promega*, 0.5 µL de primer ITS 1 Forward, 0.5 µL de primer ITS 4 Reverse, 10 µL de agua libre de nucleasas, 0.5 µL DMSO (dimetil sulfóxido) y 1 µL de ADN resultando en un volumen final de 25 µL en cada tubo según lo descrito en el manual de promega M7841. La corrida de la PCR se realizó en el termociclador

marca Labnet Multigene en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, annealing a 53 °C por 1 minuto, extensión inicial por 1 minuto a 72 °C y extensión final de 10 minutos a 72 °C seguido de mantenimiento a 4 °C (Beltran & Rincón, 2014).

Los productos obtenidos de la corrida de PCR se observaron por medio de electroforesis horizontal utilizando la misma metodología empleada para la extracción de ADN.

- **Secuenciación**

Se colocó 20 µL de producto de PCR a una concentración de 20 ng en tubos eppendorf de 1.5 mL. Los tubos se enviaron a la empresa Macrogen en Corea del Sur para la secuenciación, las cuales fueron analizadas mediante la técnica Sanger.

- **Análisis de secuencias**

Se utilizó el programa FinchTV versión 1.4.0 para analizar la validez de las secuencias. Posteriormente se siguió la metodología de Arrieta y otros (2012) en la cual cada secuencia fue comparada con secuencias encontradas en la base de datos del GenBank por medio de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

2.2.3.3 Aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*

Se adquirió una cepa certificada ATCC 9027, que se activó en medio TSB y se incubó durante 24 horas a 37 °C, siguiendo la ficha del fabricante.

2.2.3.4 Identificación de *Pseudomonas aeruginosa*

A. Identificación macroscópica

Se observaron las características a las 24 horas de siembra de las colonias formadas en la superficie de agar, sus bordes y elevaciones. Posteriormente la apariencia y el color que presentaba después de las 24 horas fueron comparadas con las imágenes del libro de Brooks, Carroll, Butel, Morse y Mietzner (2014).

B. Identificación microscópica

Se utilizó la guía de Molano y Flórez (2016) para realizar la tinción Gram en donde se colocó 0.05 mL de agua destilada en el portaobjetos, con un asa estéril se tomó una muestra de las colonias presentes en las cajas Petri sembradas anteriormente, se mezcló la muestra con el agua y se pasó unas 3 veces el portaobjetos por el mechero fijando la muestra. Se aplicó 0.1 mL de cristal violeta esperando 1 minuto y se enjuagó con agua, después se aplicó 0.05 mL de Lugol, se esperó por 1 minuto y se enjuagó, se colocó 0.1 mL de alcohol cetona esperando 30 segundos y se enjuagó, la safranina se aplicó 0.1 mL esperando 30 segundos, se enjuagó y se dejó que se seque cerca del mechero. Las imágenes observadas fueron comparadas con el libro mencionado anteriormente.

2.2.4 Conservación de microorganismos

A. Conservación de *Aspergillus niger* y *Pleurotus ostreatus*

Se colocó 1 mL de glicerina al 10 % en tubos eppendorf de 2 µL y se esterilizaron en el autoclave a 121 °C. Con un asa micológica, se retiró de las cajas Petri un pedazo de los hongos y se colocó dentro de los tubos Eppendorf etiquetándolos respectivamente. Se repitió 3 veces este proceso y se almacenó a 5 °C en el refrigerador (Garzon, 2013) (UNC, 2016).

B. Conservación de *Pseudomonas aeruginosa*

Se tomó con el asa microbiológica varias colonias de una caja Petri y se dispersaron en el medio que contiene el tubo de CRYOBANK, se agitó por 3 minutos con el objetivo de que la bacteria se adhiriera a las perlas, finalmente se removió el medio de cultivo del tubo con una micropipeta estéril y se congeló a una temperatura de -80 °C (Arana, Orruño, & Barcina, 2010) (UNC, 2016).

2.2.5 Preparación del inóculo

2.2.5.1 Preparación de inóculos de hongos

Se tomaron micelios de 5 días de crecimiento. Para el hongo *Aspergillus niger* se utilizó un asa de platino para raspar toda la superficie del agar y depositar el cuerpo fúngico y para *Pleurotus ostreatus* se utilizó un bisturí estéril para desprender el micelio del agar. Cada especie fue colocada en un frasco boeco de 500 mL que contenía 200 mL de agua destilada estéril. Esta técnica se realizó en una cámara de flujo laminar. Posteriormente en cada inóculo se realizó el recuento de conidios en una cámara de Neubauer ajustando a la concentración de 6×10^8 conidios/mL, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Conidias / mL} = \# \text{ de conidias contadas} \times 25.000 \times \text{factor de dilución}$$

Fórmula 2. Conteo de Conidias/mL

Fuente: (Cañedo & Ames, 2004)

2.2.5.2 Preparación de inóculo de la bacteria

Se utilizó el protocolo de Ibarra y Paredes (2013). Se tomó varias colonias de *Pseudomonas aeruginosa* con la ayuda de un asa microbiológica, se colocaron en 6 tubos Falcon plásticos de 100 mL que contenían 50 mL de medio TSB y se incubaron por 24 h a una temperatura de 35 ° C. Después de las 24 h se procedió a centrifugar los 6 tubos Falcon durante 15 minutos a 3500 rpm, desechando el medio TSB y quedando solo el pellet bacteriano en el fondo de los tubos. El pellet de cada tubo Falcon fue suspendido con 45 mL de agua destilada estéril y se lo homogenizó en un vórtex por 1 minuto. Finalmente se colocó en un frasco boeco de 1000 mL estéril aforándolo a 800 mL con agua destilada estéril.

Con la solución obtenida se procedió a medir la concentración de 10^8 UFC/mL en un espectrofotómetro UV visible previamente calibrado, siguiendo la metodología de Muñoz (2016). Se seleccionó la longitud de onda de 650 nm (nanómetros) mediante la solución blanco (agua destilada estéril) colocada previamente en una celda de plástico, se situó en el porta celdas dentro del espectrofotómetro con el objetivo de ubicar el contador en 0 para iniciar la medición, se removió el “blanco” del porta celdas y se colocó una celda nueva con 1 mL de la solución preparada de *Pseudomonas*, se realizó la medición, hasta alcanzar una absorbancia de 0.200 ± 0.010 , para lograr una dicha concentración.

2.2.6 Aplicación de agua destilada

Mediante un atomizador de plástico de 500 mL estéril, se colocó 100 mL de agua destilada en cada caja de los tratamientos, removiendo hasta la homogenización total. Este procedimiento fue realizado entre las 7 am – 8 am, 2 veces por semana durante 3 meses.

2.2.7 Aplicación del inóculo

Se aplicó 100 mL de inóculo de cada microorganismo *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando un atomizador de plástico de 500 mL esterilizado por baño María, en los tratamientos y repeticiones correspondientes. La aplicación se realizó a las 7 am – 8 am, 2 veces a la semana por 3 meses.

A. Aplicación del consorcio.

Se tomó 33.3 mL de cada inóculo (*Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa*) respectivamente, se mezcló en un atomizador de plástico de 500 mL estéril hasta un volumen final de 100 mL, se aplicó en el tratamiento y repeticiones correspondiente entre las 7 am y 8 am, 2 veces por semana durante 3 meses.

2.2.8 Diseño Experimental

El diseño experimental consistió en un diseño de bloques completos al azar (DBCA) construido con 6 tratamientos y 3 repeticiones obteniéndose un total de 18 unidades experimentales (tabla 6).

Las variables a medir fueron Temperatura, pH, Humedad, Conductividad eléctrica 2 veces por semana. La concentración de TPH's y HAP's al inicio y al final del ensayo.

2.2.8.1 Tratamientos del ensayo

Tabla 6.

Tratamientos del ensayo

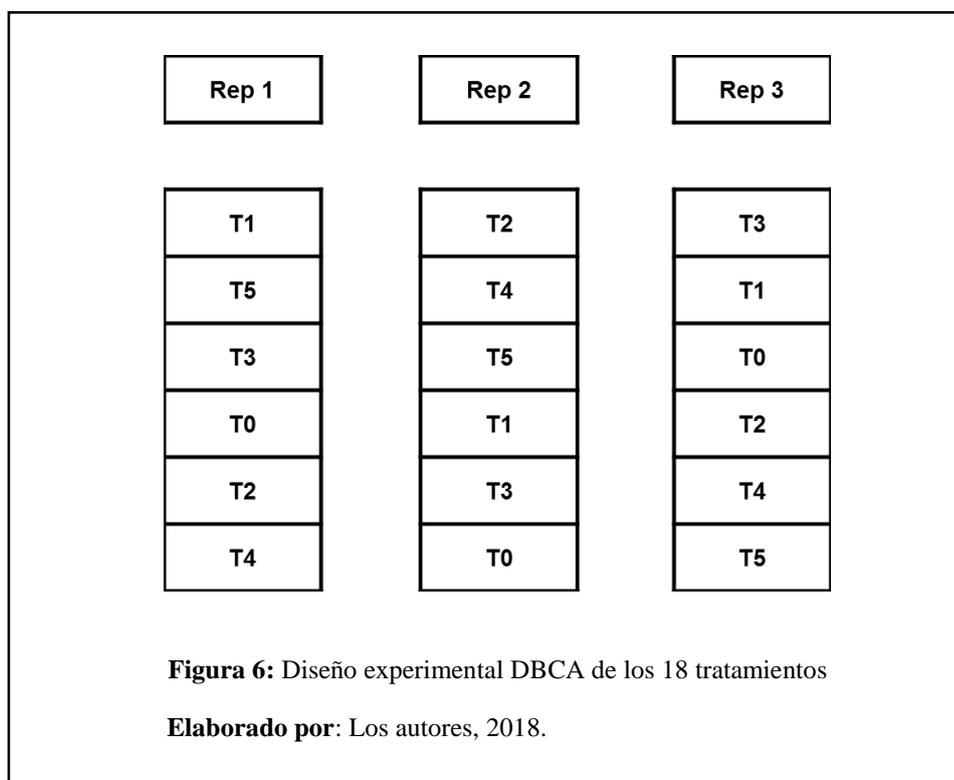
Tratamiento	Contenido	Dosis
T0	Suelo	2.5 kg + agua destilada
T1	Suelo contaminado	2.5 kg + agua destilada
T2	Suelo contaminado <i>Aspergillus niger</i>	2.5 kg + 10 ⁸ UFC/mL
T3	Suelo contaminado + <i>Pleurotus ostreatus</i>	2.5 kg + 10 ⁸ UFC/mL
T4	Suelo contaminado + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.5 kg + 10 ⁸ UFC/mL
T5	Suelo contaminado + <i>Aspergillus niger</i> + <i>Pleurotus ostreatus</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.5 kg + 10 ⁸ UFC/mL de cada microorganismo

Nota: Elaborado por los autores, 2018

2.2.8.2 Disposición de los tratamientos del ensayo.

Se dispuso de 18 cajas en un DBCA con tres repeticiones que tuvieron condiciones ambientales homogéneas.

Disposición de tratamientos



2.2.9 Análisis fisicoquímicos

Estos análisis se efectuaron en los laboratorios de suelos y agua del centro de apoyo de Cayambe de la Universidad Politécnica Salesiana. Fueron realizados los análisis al inicio y al final del ensayo. Los parámetros físicos químicos analizados fueron: materia orgánica, P, K, Ca, Mg asimilable, Fe, Mn, Cu, Zn, Sodio intercambiable, B y S extraíble, pH, conductividad eléctrica, textura y clase textural, basados en procedimientos estandarizados internacionales (Ver anexo 7).

Tabla 7.

Parámetros analizados y su metodología.

Parámetro	Método de Valoración	Unidades de Medición
Materia Orgánica	Test de Nitratos de Merck	%
N total	Kjeldahl	% p/p
P total	Colorimetría por el método Duval	% p/p
Ca-Mg-K-Na intercambiable	Acetato de amonio – Centrífuga	% p/p
B, Fe, Mn, Cu, Zn	Turbidimétrico -Fotocolorimetría	ppm/100g

Nota: Elaborado por los autores, 2018.

2.2.10 Análisis de TPH's y HAP's

Se realizaron análisis al inicio y al final del ensayo en el laboratorio ambiental de GRUNTEC Environmental Services, donde se analizó TPH's por el método EPA 8015 y HAP's por el método EPA 8270.

2.2.11 Variables del ensayo

Temperatura y Humedad

En cada caja se midió la temperatura y humedad todos los días durante 3 meses con la ayuda de un termómetro higrómetro, expresando en grados centígrados y porcentaje respectivamente.

pH y Conductividad eléctrica

Se utilizó una relación 1:2 (5 g de suelo en 10 mL de agua destilada), se agitó y dejó reposar por 5 minutos, después de este tiempo se agitó nuevamente y mediante el potenciómetro de bolsillo calibrado se midió el pH y la conductividad eléctrica introduciendo el electrodo correspondiente en la solución, se esperó 10 segundos y se registró los valores de pH y conductividad eléctrica en dS/m. se midió 2 veces por semana durante 3 meses.

2.2.12 Análisis Estadístico

Para los datos obtenidos de las variables se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) con Tukey al 5% mediante el programa InfoStat para el análisis. Para los TPH's y HAP's se comparó los resultados de los análisis realizados al inicio y al final del ensayo.

Capítulo 3

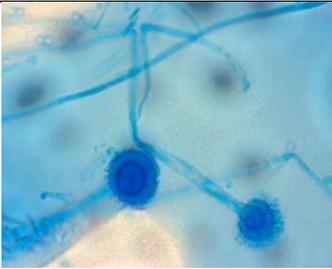
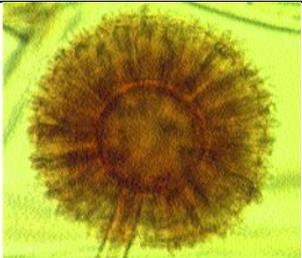
Resultados y Discusión

3.1 Identificación de microorganismos

3.1.1 Identificación de *Aspergillus niger*

Tabla 8.

Identificación macroscópica y microscópica de *Aspergillus niger*

	Criterio	Identificación en laboratorio	Identificación Bibliográfica
macroscópica	Coloración del micelio	 Fuente: Los autores, 2018	 Fuente: (Araujo, y otros, 2016)
	microscópica	Conidióforo	 Fuente: Los autores, 2018
Cabezuelas radiadas		 Fuente: Los autores, 2018	 Fuente: (Abarca, 2000)

Elaborado por: Los autores, 2018

En la tabla 8 se puede apreciar las características macroscópicas del hongo en incubación a 25 °C, el cual presentó forma filamentosa, textura algodonosa, bordes filamentosos, crecimiento micelial blanco inicial y una vez maduro toma coloración negra, la elevación del micelio de 5 mm y no presenta exudado. El reverso de la caja tiene una coloración blanco amarillento. Según Abarca (2000) y Araujo y otros (2016) las características propias del hongo son micelio elevado color negro azabache una vez maduro, textura flocosa, bordes ramificados, vista al reverso incolora o color crema.

Las características microscópicas se observaron en lente de 100X. En la figura se observa un conidióforo biseriado liso de gran tamaño, vesícula esférica con fiálides y métulas las cuales poseen conidios esféricos y oscuros. Según Abarca (2000) y Medicina & Laboratorio (2010) *Aspergillus niger* posee conidióforos lisos, hialinos o pigmentados entre 1.5 a 3 mm de largo y diámetro de 15 a 20 μm . La vesícula es casi esférica con 50-100 μm de diámetro, contiene fiálides biseriadas sobre ella a partir de las que brotan conidios globosos y rugosos con 4 a 5 μm de diámetro, color castaño o marrón a negro. Al comparar bibliográficamente (Tabla 8) se confirmó que la cepa aislada en el laboratorio fue de *Aspergillus niger*.

3.1.2 Identificación de *Pleurotus ostreatus*

Tabla 9.

Identificación macroscópica y microscópica de *Pleurotus ostreatus*

	Criterio	Identificación en laboratorio	Identificación Bibliográfica
Macroscópica	Coloración del micelio	 Fuente: Los autores, 2018	 Fuente: (Fernandez & Henao, 2007)
	Formación de anillos concéntricos	 Fuente: Los autores, 2018	 Fuente: (Moreno & Ospina, 2008)
microscópica	Basidios	 Fuente: Los autores, 2018	 Fuente: (Fernandez & Henao, 2007)
	Basidiosporas	 Fuente: Los autores, 2018	 Fuente: (Fernandez & Henao, 2007)

Elaborado por: Los autores, 2018

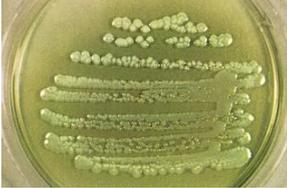
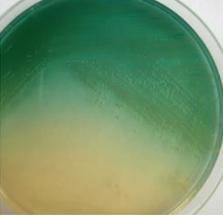
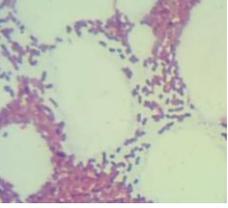
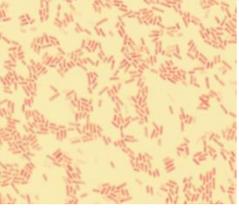
En la tabla 9 se puede apreciar el crecimiento macroscópico de *Pleurotus ostreatus* en el laboratorio, en donde su crecimiento cubrió toda la caja Petri en 10 días. El micelio posee una coloración blanca algodonosa de 0.6 mm de altura, no esporulenta, formó anillos concéntricos sobre el medio de cultivo, una vez maduro el micelio segrega una sustancia amarilla aceitosa que posee los metabolitos secundarios, además su crecimiento es rápido. Esta morfología coincide con Fernandez & Henao (2007) como se aprecia en la columna derecha, en donde *Pleurotus* posee micelio blanco algodonoso, con abundante micelio aéreo y formación de anillos concéntricos hacia el extremo, lo que demuestra que los resultados obtenidos en laboratorio responden a la especie de *Pleurotus ostreatus*.

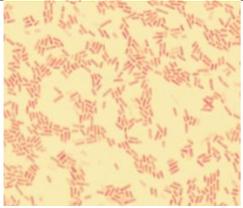
Las características microscópicas se observaron con un lente de 100X. En la tabla se diferenció hifas septadas, basidios y sus respectivas basidiosporas las cuales son esféricas y ovaladas. Según Fernandez & Henao (2007) este hongo posee hifas hilianas delgadas y septadas, los basidios son largos y entrecruzados como una malla y las basidiosporas cilíndricas con paredes delgadas, hilianas y lisas. Al comparar los resultados obtenidos con la literatura (Tabla 9) se ratificó que el hongo obtenido en el laboratorio fue *Pleurotus ostreatus*.

3.1.3 Identificación de *Pseudomonas aeruginosa*

Tabla 10.

Identificación macroscópica y microscópica de *Pseudomonas aeruginosa*

	Criterio	Identificación en laboratorio	Identificación Bibliográfica
macroscópica	Colonias redondas, color cremoso	 Fuente: Los autores, 2018	 Fuente: (Medical Press, 2015)
	Pigmentación verdosa del medio	 Fuente: Los autores, 2018	 Fuente: (Brooks, Carroll, Butel , Morse, & Mietzner, 2014)
	Fluorescencia bajo luz UV	 Fuente: Los autores, 2018	 Fuente: (Medical Press, 2015)
microscópica	Gram negativos	 Fuente: Los autores, 2018	 Fuente: (Brooks, Carroll, Butel , Morse, & Mietzner, 2014)

	Bacilos	 <p data-bbox="711 409 995 436">Fuente: Los autores, 2018</p>	 <p data-bbox="1038 403 1394 465">Fuente: (Brooks, Carroll, Butel , Morse, & Mietzner, 2014)</p>
--	---------	--	---

Elaborado por: Los autores, 2018

En la tabla 10 se observan los resultados obtenidos del cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* en incubación a 37 °C. La tabla muestra colonias planas de margen entero y forma puntiforme de color blanco-amarillento que después cambian a color verdoso fluorescente, al ser vista bajo luz UV. Según Ruiz (2007) esto se debe a un pigmento llamado pioverdina donde las colonias sometidas a luz UV con una longitud de onda de 254 nm se tornan fluorescentes. Esta técnica permitió corroborar la morfología típica de *Pseudomonas aeruginosa* con la literatura (Tabla 10).

Utilizando la tinción Gram, microscópicamente se observó que la bacteria es un bacilo Gram negativo. Según Brooks, Carroll, Butel, Morse, & Mietzner (2014) mencionan que los bacilos pueden medir 0.60 x 2 µm y su disposición puede ser individual, en cadenas cortas o pares. Comparando las imágenes obtenidas con la literatura se ratificó que la bacteria es *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 10).

3.1.4 Identificación molecular de *Aspergillus niger* y *Pleurotus ostreatus*

Se obtuvo un tamaño de ADN aproximado de 1000 pb como se puede observar en el gel de agarosa (Ver anexo 8) que comparando con Beltran & Rincón (2014) donde extrajeron ADN de hongos fitopatógenos, obtuvieron pesos moleculares de 900 pb a 1200 afirmando que es el peso de la cadena de ADN para hongos.

Las cadenas obtenidas de la región ITS (Ver anexo 8) fueron de 638 pb y 630 pb de *Aspergillus niger* (AN1) y *Pleurotus ostreatus* (PO2) respectivamente, que comparando con Garzon (2013) la región ITS se encuentran en rangos de 500 pb a 750 pb en donde se constata que la región ITS es de los hongos en estudio.

Tabla 11.

Análisis de secuencias de rARN amplificadas entre el ITS1 e ITS4 en el programa BLAST

Código	Hongo aislado	Identidad	Secuencia obtenida
AN1	<i>Aspergillus niger</i>	99 %	TCCGCGCGCATTGTGTGTAACCTTGTCCGGCCCCCTGCC AGGGATGATAATATGGCCCCGGGGTTAAGAGAACCT GTAAGAGGGTATAAGTGAGTCCTCTGCATATTCAGCG AAACGACGTGTGAACTACTTACCTTGGCCTCGGCGAA CTGCCGCCAAAAGCTGGTCGGCCATGACCTGCTCCGGA TCAACCACGTTCTCATCATGCCGTAGCTGCTCAAAGG CAGGGTCTGGGCCAGATTAAGCATGCCCATATAAA CATACCCCTGTGGGTGGTACAAAGGAGAAAATAGG GACGTCGCCGAGATGGGCGACAAGGGTTCCGGTTGC CTTCGCCGCGTAACCGACGCGAAAATGCTGCGAAAA GGCGTCTATCATCCAGTCGCGTCGGCGACAGTACTCG ACGCCAGCCCCTGCAGCCATCCAAGATAGCCGTCGA TACCCAGCTTTGCAAGAGGCGGAGGGTAAGTGCTTG TGATAGGCCAGATGGGTCCTGCGTCTCAACCTCGGTC GCACGCAGCAGTCGTTCCGGTAAACAATGGATTGCGA CAAAGTAACCGAGCCGACAGACCTGGTGCCAGCGTTT ACTAAAAGACTCCAGCCGGATTACACGGCCCTGGTG GTCAA
PO2	<i>Pleurotus ostreatus</i>	100 %	CCTTCCTTCCGGTTATTATATGCTTAAGTTCAGCGGG TAGTCCTACCTGATTGAGGTCAAATTGTCAAATTGT CCTTGCGGACGATTAGAGAGCTGGACTCTATTTCATGC GTGCTATTGATGAGTGATAATTATCACATCATGCGCA GAGGCAATGAGAAGTCCTGCTAATGCATTTAAGAGG AGCCGACCTGTCAAGGCCAGCAGCCCCAACAAATCC AAACATCACAATTGGAAGAAACCAAGTGAGTTTG AGAATTTAATGACACTCAAACAGGCATGCCCCCTCGGA ATACCAAGGGGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGAT GATTAATGAAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAT TTCGTTGCGTTCTTCATCGATGCGAGACCAAGAGAT CCGTTGTTGAAAGTTGTATTATGGTTTAAAGGCACAA GGCCATTAATGACATTCGTAGACATACATTGGGG TGTGTAAGTAAATAGACTGCGTAGTCACACCGAGAC GTTTAAATCCCAGCAACCAAGTCTGACGACTTGAGAG ACGACTTCACAGATCTATCAAAGTTCACAGGTGGTT GAAAGACTAGTGAAGCGTGCACATGCCCTAGAGGC CAGCAACAACCTCC

Elaborado por: Los autores, 2018

En la tabla 11 se obtuvieron porcentajes de identidad al comparar las secuencias de rARN amplificadas y secuenciadas en el programa Blast. Para *Aspergillus niger*

(AN1) de 98 % y *Pleurotus ostreatus* (PO2) de 100 %, esto al comparar con lo mencionado por UNC (2016) cuando los porcentajes de identidad son iguales o superiores al 97 % se ha identificado a nivel de especie y al presentar un porcentaje menor se identifica a nivel de género. Confirmando que se está trabajando con las especies *Aspergillus niger* y *Pleurotus ostreatus*.

3.2 Análisis Estadístico de las Variables de estudio

3.2.1 Humedad

Tabla 12.

Análisis de varianza para variable humedad y Tukey al 5 %.

Tratamiento	Humedad promedio (%)	Rango	C.V (%)	Significancia
T0	56.77	A	1.48	NS
T1	57.00	A		
T2	57.53	A		
T3	56.80	A		
T4	56.87	A		
T5	58.57	A		

Nota: CV: coeficiente de variación; T0: Suelo testigo; T1: Suelo+ Hidrocarburo; T2: Suelo+ Hidrocarburo +*Aspergillus niger* T3: Suelo+ Hidrocarburo+ *Pleurotus ostreatus* T4: Suelo+ Hidrocarburo +*Pseudomonas aeruginosa*; T5: Suelo+ Hidrocarburo +*Aspergillus niger* +*Pleurotus ostreatus*+ *Pseudomonas aeruginosa*.

NS: **no significativo**

Elaborado por: Los autores, 2018

En la tabla 12 se observa que los promedios de humedad se presentaron de la siguiente manera T5 con mayor porcentaje 58.57 %, seguido del T2 con 57.53 %, y finalmente T0 con 56.77 %.

Los datos obtenidos oscilaron en el rango de 58.57 % a 56.77 % debido a que los tratamientos presentaban diferentes tipos de microorganismos de los tratamientos,

donde el primer porcentaje corresponde al consorcio y el segundo porcentaje corresponde a la carga microbiana autóctona del suelo, por lo cual el aprovechamiento del agua para su desarrollo era diferente.

El T5 presentó mayor porcentaje de humedad probablemente por el consorcio microbiano y la transformación de TPH's y HAP's en CO₂ y H₂O (Araujo y otros, 2016) por reacciones de oxidación, solubilización, posibilidad de dispersión y con ello la disponibilidad de nutrientes; mismos que fueron asimilados por los microorganismos inoculados y autóctonos (Jiménez y Guerra, 2016).

Los T4, T3, T2 y T1 al presentar hidrocarburo retuvieron la humedad probablemente por la polaridad entre el agua y el contaminante el cual retardo el drenaje en el suelo comparado con T0 que no presentó hidrocarburo y su drenaje fue más rápido (Pascual y Venegas, 2015) (Trejos, 2017).

Al aplicar Tukey al 5 %, se obtiene que todos los tratamientos están en el rango de significancia categorizados con la letra "A", lo que indica que estadísticamente son iguales y no poseen diferencia significativa. Se observa un C.V. de 1.48 %, demostrando que los datos poseen una dispersión mínima y son confiables para este tipo de ensayo.

3.2.2 Temperatura

Tabla 13.

Análisis de varianza para variable temperatura y Tukey al 5 %.

Tratamiento	Temperatura promedio (°C)	Rango	C.V (%)	Significancia
T0	16.53	A	0.49	NS
T1	16.53	A		
T2	16.53	A		
T3	16.57	A		
T4	16.73	A		
T5	16.63	A		

Nota: CV: coeficiente de variación; T0: Suelo testigo; T1: Suelo+ Hidrocarburo; T2: Suelo+ Hidrocarburo +*Aspergillus niger* T3: Suelo+ Hidrocarburo+ *Pleurotus ostreatus* T4: Suelo+ Hidrocarburo +*Pseudomonas aeruginosa*; T5: Suelo+ Hidrocarburo +*Aspergillus niger* +*Pleurotus ostreatus*+ *Pseudomonas aeruginosa*.

NS: **no significativo**

Elaborado por: Los autores, 2018

En la tabla 13 se observa que las temperaturas de los tratamientos oscilaron entre 16.73 °C a 16.53 °C con una variación de décimas. Así T4 tiene una temperatura de 16.73 °C, seguido de T5 con 16.63 °C y finalmente T2, T1 y T0 con 16.53 °C.

El rango de temperatura obtenida en el ensayo no fue la óptima, sin embargo, se encontraba dentro de los rangos para el crecimiento de microorganismos mesófilos y una viable biorremediación. Según Pardo, Perdomo y Benavides (2004) las temperaturas de biorremediación deben oscilar entre 15 °C a 47 °C y humedades de 40 % a 60 %, donde se asegura una activación del metabolismo de los microorganismos y crecimiento de los mismos (Pascual & Venegas, 2015).

Así, según Vilasó, Rodríguez y Ábalos (2016) para *Pseudomonas aeruginosa* al estar en rangos de temperaturas de 15 °C a 50 °C mantiene la actividad de remoción de petróleo por medio de surfactantes rompiendo la tensión interfacial que existe entre

agua-hidrocarburo. El rápido crecimiento y adaptación de la bacteria al sustrato comparada con los hongos hizo de esta una excelente candidata para procesos de biodegradación de hidrocarburos (Molano & Flórez, 2016). Al comparar con los hongos *Aspergillus niger* y *Pleurotus ostreatus* su crecimiento micelial ocurre en temperaturas de 15 ° C a 45 ° C, en un tiempo de 48 h a 72 h (Gayosso, 2001), lo que retrasó la biorremediación. Las reacciones degradativas-oxidativas de hongos en hidrocarburos se ha visto principalmente en las enzimas lacasas responsable de romper anillos aromáticos y cadenas ramificadas de los hidrocarburos (Guzmán, Zuñiga, Santafé, Torres, & Angulo, 2009).

Al aplicar Tukey al 5 %, se obtiene que todos los tratamientos están en el rango de significancia categorizados con la letra “A”, lo que indica que estadísticamente son iguales y no poseen diferencia significativa. Se observa un C.V. de 0.49 %.

3.2.3 pH

Tabla 14.

Análisis de varianza para variable pH y Tukey al 5 %.

Tratamiento	pH (µds) promedio	Categoría	C.V (%)	Significancia
T0	7.15	A	1.03	NS
T1	7.14	A		
T2	7.14	A		
T3	7.20	A		
T4	7.16	A		
T5	7.16	A		

Nota: CV: coeficiente de variación; T0: Suelo testigo; T1: Suelo+ Hidrocarburo; T2: Suelo+ Hidrocarburo +*Aspergillus niger* T3: Suelo+ Hidrocarburo+ *Pleurotus ostreatus* T4: Suelo+ Hidrocarburo +*Pseudomonas aeruginosa*; T5: Suelo+ Hidrocarburo +*Aspergillus niger* +*Pleurotus ostreatus*+ *Pseudomonas aeruginosa*.

NS: no significativo

Elaborado por: Los autores, 2018

En la tabla 14 se puede apreciar que los tratamientos tuvieron valores que oscilaron entre 7.20 y 7.14, así el tratamiento T3 presentó mayor pH con 7.20, seguido de T4 y T5 con 7.16 y finalmente T1 y T2 con 7.14.

El pH inicial fue 6.72 misma que al finalizar el ensayo aumentó unas décimas, probablemente por los nutrientes presentes en el suelo que pudieron hidrolizarse por ello el pH final aumentó. Según Ñustez (2012) la hidrólisis consume protones incrementando así el pH del suelo contaminado, seguido de una ligera reducción debido a la fijación y asimilación de nitrógeno, al oxidar el amonio.

Los valores obtenidos en el ensayo están dentro del rango óptimo para la biodegradación entre 6 a 8 y permite el desarrollo de las poblaciones microbianas y la actividad biodegradadora de sus enzimas (Cecotti, Morelli, & Coppotelli, 2015).

El pH determina la disponibilidad de nutrientes y adsorción de iones por el suelo por lo que influye mucho en la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos (Bhattacharya, Das, & Palaniswamy, 2016).

T3 llegó a tener un pH más alto en comparación con los otros tratamientos debido a que las enzimas presentes en el género *Pleurotus* pueden oxidar y reducir iones afectando así el valor del pH y disminuyendo la concentración de hierro y cobre (Corrales, Arévalo, & Moreno, 2014). Según Moreno & Ospina (2008) las fenoloxidasas (lacasas) tienen capacidad de oxidar sustancias recalcitrantes como HAP's, esencialmente requiere de cobre y oxígeno. A comparación de T1 y T2 que presentaron valores menores de pH posiblemente al mecanismo de acción de las enzimas lipasas, dejando radicales libres lo que ocasionó la acidificación del medio (Cruz, 2007), esta reacción se ha visto en hongos autóctonos de suelos arenosos de la región amazónica como lo menciona Araujo y otros (2016) en su estudio:

Biocatalizadores fúngicos hidrocarbonoclasticos del género *Aspergillus* para las descomposición de agua con Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos, en donde demuestran dicha acción en *Aspergillus niger*.

Aplicando Tukey al 5 %, se obtiene que todos los tratamientos están en el rango de significancia categorizados con la letra “A”, lo que indica que estadísticamente son iguales y no poseen diferencia significativa. Se observa un C.V. de 1.03%.

3.2.4 Conductividad eléctrica

Tabla 15.

Análisis de varianza para variable conductividad eléctrica y Tukey al 5 %.

Tratamiento	C.E promedio (dS/m)	Categoría	C.V (%)	Significancia
T0	0.0026	A	2,09	**
T1	0.0028	AB		
T2	0.0029	B		
T3	0.0028	AB		
T4	0.0027	A		
T5	0.0027	A		

Nota: CV: coeficiente de variación; T0: Suelo testigo; T1: Suelo+ Hidrocarburo; T2: Suelo+ Hidrocarburo +*Aspergillus niger* T3: Suelo+ Hidrocarburo+ *Pleurotus ostreatus* T4: Suelo+ Hidrocarburo +*Pseudomonas aeruginosa*; T5: Suelo+ Hidrocarburo +*Aspergillus niger* +*Pleurotus ostreatus*+ *Pseudomonas aeruginosa*.

** : **significativo**

Elaborado por: Los autores, 2018

En la tabla 15 para la variable conductividad eléctrica, se muestra valores que oscilaron entre 0.0026 dS/m a 0.0029 dS/m. Así T2 con 0.0029 dS/m, seguido de T1, T3 con 0.0028 dS/m y finalmente T0 con 0.0026 dS/m.

Los rangos de significancia con las letras “A”, “B” y “AB” muestran un comportamiento diferente de cada tratamiento y un coeficiente de variación de 2.09

%, lo cual establece que los datos son confiables y se encuentra dentro del rango permitido para este ensayo experimental.

Las conductividades de los tratamientos disminuyeron hasta el final del ensayo comparadas con la conductividad eléctrica inicial del suelo 0.20 dS/m; posiblemente al contenido de nutrientes propios del suelo, los cuales sirvieron a los microorganismos para su desarrollo y metabolismo. Cabe indicar que el testigo presenta el valor más bajo debido a que no contenía hidrocarburo como el resto de tratamientos. T2, T3 y T4 presentan valores más altos posiblemente a que el hidrocarburo presenta contenido de sales en su composición.

Romero, Santamaría, & Zafra (2009) indican que la conductividad eléctrica disminuye debido al crecimiento de los microorganismos y recuperación del suelo con asimilación de Na, Mn y N.

Según Ñustez (2012) la biorremediación depende de la transferencia de electrones, en la cual las enzimas obtienen energía oxidando materiales residuos, los aceptores más utilizados son el oxígeno y nitratos mismo que son transformados por oxigenasas en dióxido de carbono, agua y masa celular.

Según el TULAS (2012) los rangos permitidos de recuperación del suelo están no mayores a 4 dS/m, indicando que el ensayo está dentro del parámetro.

Al finalizar el ensayo se evidenció que la conductividad eléctrica disminuyó, asegurando que los microorganismos transformaron las sales, nutrientes y moléculas orgánicas del suelo en energía para sus metabolismos.

La prueba de Tukey al 5 % indica que los datos obtenidos están dentro del rango categorizado como “A” para T0, T4, T5, “AB” para T1, T3 y finalmente “B” para

T2, es decir, son estadísticamente diferentes y en el ANOVA les establece como significativas.

3.3 Biodegradación de hidrocarburos TPH's

Tabla 16.

Análisis degradación TPH's en los tratamientos

Tratamiento	Concentración Inicial (mg/kg)	Concentración final Media (mg/kg)	Remoción (%)
T1	104.231	90.183	13
T2	104.231	84.722	19
T3	104.231	93.385	10
T4	104.231	60.156	42
T5	104.231	58.342	44

Nota: T0: Suelo testigo; T1: Suelo+ Hidrocarburo; T2: Suelo+ Hidrocarburo +*Aspergillus niger* T3: Suelo+ Hidrocarburo+ *Pleurotus ostreatus* T4: Suelo+ Hidrocarburo +*Pseudomonas aeruginosa*; T5: Suelo+ Hidrocarburo +*Aspergillus niger* +*Pleurotus ostreatus*+ *Pseudomonas aeruginosa*.

Elaborado por: Los autores, 2018

En la tabla 16 se observa que los tratamientos tuvieron una concentración inicial de TPH's 104.231 (100 %), la cual disminuyó en todos los tratamientos siendo T5 el tratamiento con mayor porcentaje de biodegradación de hidrocarburos (TPH) con 44 %, seguido de T4 con 42 % y finalmente T3 con 10 %.

Los tratamientos T5 y T4 presentan valores de biodegradación de 44 % y 42 % respectivamente, posiblemente al estar presente en los dos tratamientos *Pseudomonas aeruginosa* que utilizó alcanos como fuente principal de carbono, su metabolismo comprende de 5 horas para adaptarse a condiciones adversas (Varjani, Rana, Jain, Bateja, & Upasani, 2015). Metaboliza diferentes substratos entre los cuales están hidrocarburos alifáticos y aromáticos, en su genoma posee plásmidos, operones y transposones que le permiten transferir genes por lo que puede adaptarse a condiciones adversas y distintos contaminantes; los biosurfactantes que produce le permiten la interacción con el hidrocarburo al solubilizarlo (Ruiz, 2007) (Gómez, y

otros, 2008) (Fracchia, Cavallo, & Martinotti, 2012). Por otro lado, los hongos *Aspergillus niger* y *Pleurotus ostreatus* tienen como su alimento principal a la materia orgánica (Loaiza, 2017) y al estar en presencia de anillos de benceno estimulan enzimas como las manganasas, lipasas, fenoloxidasas y lacasas que rompen los anillos permitiendo la asimilación del contaminante; sin embargo, su metabolismo es retardado por adaptación al sustrato y por lo tanto la síntesis de sus enzimas empieza a partir de 48 horas (Cervantes, Salazar, & Díaz, 2013).

Según Trujillo & Ramírez (2012) el consorcio microbiano conlleva una rápida biodegradación por su acción de enzimas que trabajan en conjunto.

La biodegradación del T2 y T3 con 19 % y 10 % respectivamente, pudo verse afectada al no tener la temperatura óptima para su rápido crecimiento y por la interacción con microorganismos propios del suelo donde pudo darse comensalismo entre microorganismos. Según García (2015) las enzimas lignolíticas de *Pleurotus ostreatus* MnP, LiP y lacasas poseen baja especificidad, requieren que el contaminante este en disolución y la temperatura debe ser la óptima de 24 °C para obtener una biodegradación de 80 %. A comparación con *Aspergillus niger* que presenta además de las enzimas citadas anteriormente, lipasas y fenoloxidasas capaces de degradar más de 2 anillos aromáticos, su biodegradación es más rápida, este hongo ha trabajado en temperaturas óptimas de 24 a 25 °C donde la biorremediación ha sido de un 90 % (Araujo, y otros, 2015). Rittmann & McCarly (2001) mencionan que un pH óptimo de crecimiento para hongos es 5.5 y la temperatura está en el intervalo mesófilo de 22 °C a 30 °C, los bajos porcentajes de remoción por parte de los hongos indican que estos se desarrollaron en mayor tiempo y pudieron estar bajo estrés por lo que su complejo enzimático trabajó lentamente.

Según Díaz y otros (2013) mencionan que se ha visto remoción de hidrocarburos 31.1 ° API en un tiempo de 5 meses aplicando estos tipos de microorganismos en condiciones controladas. Comparando con la densidad del hidrocarburo 28 ° API al poseer menor cantidad de azufre y menor peso molecular (hidrocarburos medianos) la biodegradación debía ser rápida, pero al no tener todas las condiciones en control constante pudo ocasionar el retraso de la biodegradación.

T1 degradó un 13 % de TPH's, posiblemente al actuar la carga microbiana propia del suelo, proceso conocido como atenuación natural, con la cual se evidencia que en el suelo existen microorganismos capaces de degradar hidrocarburos y pudo influir en la degradación de cada tratamiento (Pernía, Demey, Inojosa, & Naranjo, 2012).

3.4 Biodegradación de hidrocarburos HAP's

Tabla 17.

Análisis degradación HAP's en los tratamientos

Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco	Valor inicial (mg/kg)	Valor final (mg/kg)
Acenafteno	<0.5	<0.1
Antraceno	<0.5	11
Benzo (a) antraceno	4.8	<0.1
Benzo (a) pireno	<0.1	<0.1
Benzo (b) fluoranteno	<0.1	<0.1
Benzo (g,h,i) perileno	<0.1	<0.1
Benzo (k) fluoranteno	<0.1	<0.1
Dibenzo (a,h) antraceno	<0.1	<0.1
Fenantreno	27	<0.1
Fluoranteno	<0.1	<0.1
Fluoreno	<0.5	<0.1
Indeno (1,2,3 c,d) pireno	<0.1	<0.1
Naftaleno	37	<0.1
Pireno	<0.1	<0.1

Elaborado por: Los autores, 2018

En la tabla 17 se observa que hubo degradación en la mayoría de HAP's como Benzo(a) antraceno, Fenantreno, Naftaleno, y un aumento en la concentración de antraceno.

La disminución de HAP's, se debe al metabolismo de los microorganismos, que tomaron como fuente de carbono a los anillos aromáticos, transformándolos en menos tóxicos. El petróleo se conforma de alcanos lineales y cicloalcanos, pero también comprenden un 30 % los aromáticos según el yacimiento del que fue extraído, al romper los anillos de los HAP's se obtiene alcanos lineales de fácil transformación (Báñez, 2014). Se ha visto que *Pseudomonas aeruginosa* degrada en un 90 % de HAP's (Cecotti, Morelli, & Coppotelli, 2015), inicialmente formando cis-dihidrodiol cuando las dioxigenasas oxidan HAP's, estos son deshidrogenados y posteriormente forman dihidroxilados que son metabolizados por vía catecol hasta terminar en CO₂ y H₂O (García, 2015). Al estar en interacción con los hongos *Aspergillus niger* y *Pleurotus ostreatus* la oxidación del anillo aromático se dio por vía citocromo P-450, formando un epóxido, que al hidratarlo generó un trans-dihidrodiol, estos pueden ser sulfonados metilados o conjugados con xilosa, glucosa o ácido glucónico, hasta obtener un compuesto menos tóxico y soluble en agua (García, 2015) (Araujo, y otros, 2015).

El aumento de antraceno se debió a la ruptura del anillo benzóico de benzo (a) antraceno originando una molécula simple menos tóxica. El metabolismo de los microorganismos en interacción transformó los HAP's en compuestos menos tóxicos y solubles, con lo que se demuestra que la biorremediación es una alternativa amigable frente a compuestos cancerígenos y recalcitrantes.

Según TULAS (2012) los resultados de cada HAP's esta dentro de los parámetros establecidos en la normativa Ecuatoriana para biorremediación en zonas industriales, agrícolas, residenciales en suelos.

Conclusiones

- La aplicación de *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa* favoreció la degradación de hidrocarburos presentes en suelos, demostrando su capacidad biorremediadora como alternativa limpia y amigable con el ambiente.
- Los análisis físicos químicos mostraron que los microorganismos transformaron el hidrocarburo en elementos menos tóxicos y de cadenas más simples con lo que se verifica una recuperación del suelo.
- La temperatura influyó en la biodegradación de TPH's y HAP's en la adaptación al sustrato y crecimiento de los microorganismos. Este factor tiene una influencia directa en el metabolismo de los microorganismos para acelerar o retardar la biorremediación de los hidrocarburos.
- *Pseudomonas aeruginosa* resulto ser el microorganismo con más alta capacidad biorremediadora, al adaptarse al sustrato y transformar los TPH's y HAP's en menos tóxicos por medio de las enzimas mono oxigenasas y di oxigenasas.

Recomendaciones

- Realizar el análisis de carga microbiana al inicio y final del ensayo para analizar si presento comensalismo entre microorganismos o cometabolismo con la carga microbiana propia del suelo.
- Utilizar lámparas para dar las condiciones óptimas de temperatura y así potenciar y acelerar la biodegradación de hidrocarburos por parte de los microorganismos, puesto que las condiciones no son del sitio original.
- Probar diferentes grados API de hidrocarburos y condiciones ambientales diferentes para medir el tiempo y la cantidad de remoción con los mismos microorganismos.
- Aplicar bioestimulación en los microorganismos autóctonos de la zona contaminada para potenciar la atenuación natural del suelo.
- Llevar el proyecto a campo para conocer su efectividad y viabilidad de los microorganismos.

Bibliografía

- Abarca, M. L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*, 79-84.
- AgenciaUN. (14 de Agosto de 2012). *CIENCIA Y TECNOLOGÍA*. Obtenido de Universidad Nacional de Colombia: <http://agenciadenoticias.unal.edu.co/detalle/article/bacterias-degradadoras-de-hidrocarburos-aliadas-clave.html>
- Alcazar, F. (13 de Marzo de 2012). *El factor suelo*. Murcia, Murcia, España. Obtenido de <http://www.um.es/docencia/geobotanica/ficheros/tema16.pdf>
- Arana, I., Orruño, M., & Barcina, I. (2010). *COMO ABORDAR Y RESOLVER ASPECTOS PRÁCTICOS DE MICROBIOLOGÍA* (Vol. 1). Vizcaya: Euskal Heriko Unibertsitatea. Obtenido de https://ocw.ehu.es/pluginfile.php/1654/mod_resource/content/1/Tema_1._Diluciones_y_concentraciones.pdf
- Araujo, B., Rojas, Y., Depool, B., Antequera, A., Rodriguez, J., & Yegres, F. (2016). MICROANÁLISIS DE UNA CEPA DE *Aspergillus niger* BIOCATALIZADORA DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS HPA. *Acta Microscopica*, 98-110.
- Araujo, J., Yegres, F., Barreto, G., Antequera, A., Depool, B., & Rojas, Y. (14 de Diciembre de 2015). Biocatalizadores fúngicos hidrocarbonoclasticos del género *Aspergillus* para las descontaminación de agua con Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPAs). *Revista Cubana de Química*, 1-33.
- ArgenBio. (2007). *Por Qué Biotecnología*. Obtenido de Biorremediación: organismos que limpian el ambiente: <http://porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=36>
- Arrieta, O., Rivera, A., Arias, L., Rojano, B., Ruíz, O., & Cardona, S. (17 de Abril de 2012). Biorremediación de un suelo con diésel mediante el uso de microorganismos autóctonos. *SISTEMA DE INVESTIGACION UN*, 15, 14. Obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/gestion/article/view/30815/39299>
- Báñez, M. (2014). Química II Fuentes de hidrocarburos. Obtenido de <http://slideplayer.es/slide/1736923/release/woothee>
- Barrios, J. (2 de Abril de 2013). *Scribd*. Recuperado el 25 de Abril de 2017, de Clasificación de los petróleos crudos: <https://es.scribd.com/doc/61623844/Clasificacion-de-los-petroleos-crudos>

- Beltran, N., & Rincón, J. (2014). Caracterización microbiológica y molecular de hongos fitopatógenos por PCR (ITS1 e ITS4), Asociados a la marchitez del aguacate (*Persea americana*) en el departamento de Risaralda. Risaralda, Colombia. Obtenido de <http://media.utp.edu.co/vicerrectoria-de-investigaciones/archivos/PONENCIA%20-%20CARACTERIZACION%20MICROBIOLÓGICA%20Y%20MOLECULAR%20DE%20HONGOS%20FITOPATOGENOS.pdf>
- Bhattacharya, S., Das, A., & Palaniswamy, M. (2016). Degradation on benzo(a)pyrene by *Pleurotus ostreatus* PO-3 in the presence of defined fungal and bacterial co-cultures. *Journal of Basic Microbiology*, 1-9.
- Borgna, A., Cosimo, J., & Fígoli, N. (2001). *Petróleo y gas natural. Reservas, procedimientos y usos*. Santa Fe, Argentina: Universidad Nacional del Litoral. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?id=jE6vRSzFqxqYC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2014). *Microbiología médica*. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A.
- Camargo, J., & Mendoza, M. (22 de Abril de 2011). *Hidrocarburos Alifáticos*. Obtenido de Introducción: <http://hidrocarburos-alifaticos.blogspot.com/>
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entopatógenos. *Centro Internacional de la papa*, 40.
- Castellano, J., & Rache, L. (2013). MICROORGANISMOS, ENZIMAS, PLÁSMIDOS Y GENES INVOLUCRADOS EN LA DEGRADACIÓN DE PLAGUICIDAS N-METILCARBAMATOS. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 105-119.
- Castro, G. (2007). *Monitoreo frente derrames de hidrocarburos*. Gobierno de Chile. Ministerio de Agricultura, Proyectos y Asesorías Ambientales. Quillota: Prasa. Obtenido de http://www.sag.cl/sites/default/files/INFORME_FINAL_ASESORIA_SAG_HCS2.pdf
- Cecotti, M., Morelli, I., & Coppotelli, B. (2015). Estudio metabólico y molecular de cultivos bacterianos degradadores de hidrocarburos aromáticos policíclicos y resistentes a metales pesados. *Química Viva*.
- Cervantes, E., Salazar, L., & Díaz, P. (2013). Lipasas inducidas por hidrocarburos del petróleo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 9-15.

- Chaves, M., Libardi, N., Borges, G., & Wisbeck, E. (2014). Production of Bioactive Substances in Fed-batch and Semicontinuous Culture by *Pleurotus ostreatus*. *Chemical Engineering Transactions*, 38, 307-312.
- Constitución de la República del Ecuador. (2016). *SUMAK KAWSAY*. Obtenido de <http://www.pucesi.edu.ec/web/wp-content/uploads/2016/04/Constituci%C3%B3n-de-la-Republica-2008..pdf>
- Contreras, D. S. (Enero de 2014). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Universidad del Bío-Bío*, 8.
- Corrales, L., Arévalo, Z., & Moreno, V. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *NOVA*.
- Cruz, M. (2007). *La contaminación de suelos y aguas. Su prevención con nuevas sustancias naturales*. Sevilla: Universidad de Sevilla.
- Díaz, J., Ricoy, C., Moreno, C., Ricoy, V., Pérez, V., & Valbuena, O. (2013). Incorporación de alcanos por bacterias degradadoras de hidrocarburos mediada por una proteína de 70 KDa unida a membranas durante la biodegradación de combustible diesel. *Interciencia*, 38, 437-442.
- Domínguez, R., Vázquez, R., Reyes, R., Arzaluz, r., & Martínez, C. (2013). Aislamiento y purificación del hongo ectomicorrízico *Helvella lacunosa* en diferentes medios de cultivo. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16, 9.
- Enríquez, C. A. (2012). Estudio de la viabilidad de crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* aplicado en inóculo líquido para uso en biorremediación. *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*, 31.
- Fernandez, J., & Henao, L. (2007). Hongos de la podredumbre blanca y fotocatalisis homogénea nanoestructurada con TiO₂ como alternativa biotecnológica para la remoción del negro reactivo 5. Colombia: Universidad Javeriana.
- Ferreira Do Nascimento, T. C., Santos Oliveira, F. J., & Pessoa De Franca, F. (2013). Biorremediación de un suelo tropical contaminado con residuos aceitosos intemperizados. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 21-28.
- Fieser, L., & Fieser, M. (1985). *Química orgánica fundamental*. Barcelona: REVERTÉ, S. A.
- Figuroa, E. (2005). *Biodiversidad marina: valoración, usos y perspectivas: hacia donde va Chile?* (Primera Edición ed.). Santiago de Chile: Editorial Universitaria.
- Flóres, L., Cadavid, A., & Sáez, A. (27 de abril de 2002). *Caracterización de una cepa nativa de Aspergillus niger y evaluación de la producción de ácido*

cítrico. Obtenido de <http://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/revista-universidad-eafit/article/viewFile/845/753>

Fracchia, L., Cavallo, M., & Martinotti. (2012). Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications – Present Status and Future Potentials. *Biomedical Science, Engineering and Technology*, 73.

García, C. (2015). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante aplicacion de sustrato post-cultivo de champiñón (Agaricus bisporus)*. Madrid: Universidad Autonoma de Madrid.

Garzon, N. (2013). Caracterización e identificación molecular de hongos de suelo aislados de los páramos de guasca y cruz verde. *Pontificia Universidad Javeriana*. Cundinamarca, Colombia. Obtenido de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/14584/GarzonGrajalesNatalia2013.pdf?sequence=1>

Gayosso, M. (Julio de 2001). Caracterización de los componentes de un extracto de primordios de *Pleurotus ostreatus* que induce su fructificación. *Universidad de Colima*, 1-78.

Gómez, S., Gutiérrez, D., Hernández, A., Hernández, C., Casallas, M., & Vargas, P. (25 de Abril de 2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. Cundinamarca, Bogotá, Colombia. Obtenido de http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA9_ART8_PSEUDO.pdf

Guzmán, M., Zuñiga, N., Santafé, G., Torres, O., & Angulo, A. (Diciembre de 2009). Actividad antioxidante y estudio químico del hongo *Pleurotus djamor* collected in Cordoba. 2. Cordoba, Córdoba.

Herveg, J. (2006). *Biología molecular*. Cochapamba, Bolivia.

Hofrichter, M. (2002). Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbiol Technology*, 454-466.

Ibarra, M., & Paredes, E. (Julio de 2013). Eficacia antibacteriana in vitro de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill.) y Paico (*Chenopodium ambrosioides* L.) en una formulación cosmética. Quito, Ecuador. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6007/1/UPS-QT03776.pdf>

Iglesias, E. (2003). *Petróleo y Gas natural: Industria, Mercado y Precios*. Madrid: Akal, S.A.

INEN. (Octubre de 2015). *Petróleo y productos derivados de petróleo. Determinación de la densidad, densidad relativa o gravedad API. Método del*

- Hidrómetro. *NTE INEN 2903*. Quito, Pichincha, Ecuador: Servicio Ecuatoriano de Normalización.
- Islas, D., Medina, S., & Gracida, J. (Marzo de 2009). *Scielo*. Obtenido de Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v26n1/v26n1a6.pdf>
- Jiménez, V., & Guerra, R. (Noviembre de 2016). Obtaining of an enriched medium to increasing the bioavailability of weathered hydrocarbons in a coastal soil. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*.
- Lezcano, J., Martínez, B., & Alonso, O. (Abril de 2015). *Pastos y Forrajes*. Obtenido de Caracterización cultural y morfológica e identificación de especies de *Aspergillus* asociadas a semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú.
- Loaiza, M. F. (2017). *Eficiencia degradativa de tres hongos benéficos Aspergillus niger, Thichoderma harzianum y Paecilomyces lilacinus sobre suelos contaminados con petróleo en la parroquia San Carlos del cantón Joya de los Sachas*. Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, Riobamba.
- López, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S., & García, J. (22 de Junio de 2006). *NOVA*. Obtenido de Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo: <http://www.unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/60/119>
- Macarulla, J., & Goñi, F. (2002). *BIOMOLÉCULAS* (Vol. Tercer). Barcelona, España: REVERTÉ, S. A.
- Maroto, M. (2012). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos.
- Márquez, A. V. (2010). Estudio de la expresión de una gen suicida en *Aspergillus niger* para su aplicación en sistemas de biorremediación., (pág. 150). Obtenido de Estudio de la expresión de una gen suicida en *Aspergillus niger* para su aplicación en sistemas de biorremediación.
- Martínez, D. (Septiembre de 2014). PRODUCCIÓN DE TRES ESPECIES DE *Pleurotus* spp. UTILIZANDO DIFERENTES SUSTRATOS; NUEVO PROGRESO, SAN MARCOS. *Universidad Rafael Landívar*. (F. d. Agrícolas, Ed.) Coatepeque. Obtenido de <http://biblio3.url.edu.gt/Tesario/2014/06/17/Martinez-Daniel.pdf>
- Medical Press*. (2015). Obtenido de Investigadores descubren vacuna candidata para la *Pseudomonas aeruginosa*: <https://www.medicalpress.es/tag/inovio-pharmaceuticals-inc/>

- Medicina & Laboratorio*. (2010). Obtenido de Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2010/myl1109-10e.pdf>
- Mendoza, J. J. (2014). Degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp. a dos temperaturas y tres pH. *Universidad Nacional de Trujillo*.
- Minería, M. d. (2010). Nociones básicas sobre hidrocarburos y combustibles. *Energía3*, 1-69.
- Molano, J., & Flórez, M. d. (Julio de 2016). Prueba piloto para la determinación de la tolerabilidad del carbofurano usando *Pseudomonas* sp proveniente del suelo. Bogotá, Colombia. Obtenido de http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/20418/41102137_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Montenegro, F. (2007). Aislamiento y selección de cepas bacterianas nativas de suelos de la XII región de Chile, para la degradación de crudos de petróleo. *Universidad Austral de Chile*, 1-119. Obtenido de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fam777a/doc/fam777a.pdf>
- Moreno, N., & Ospina, X. (11 de 2008). Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de negro reactivo 5 empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en fique. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Moronta, F. (12 de Noviembre de 2015). *Consortios microbianos y biotecnología/Microbial consortia and Biotechnology*. Obtenido de BIOTECHMIND: <https://biotechmind.wordpress.com/2015/11/11/microbial-consortia-biotech-consorcios-microbianos/>
- Moya, J., García, S., Avilés, E., Andújar, F., & Nuñez, P. (2014). Aislamiento de cepas de *Trichoderma* de suelos, sustratos y raíces de plantas en invernaderos en la Republica Dominicana. (I. D. Forestales, Ed.) *APF*, 3, 11-16.
- Muñoz, S. (Julio de 2016). Evaluación de la eficacia de *Trichoderma* sp y *Pseudomonas* sp para biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Quito, Ecuador. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13228/1/UPS-QT10474.pdf>
- Nava, M. (05 de 03 de 2014). *Venología*. Obtenido de Tipos de petróleo crudo según grado API: <http://www.venologia.com/archivos/9589/>
- Ñustez, D. (Mayo de 2012). Biorremediación para la degradación de Hidrocarburos Totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible. Pereira, Colombia. Obtenido de <http://recursosbiblioteca.utp.edu.co/tesisd/textoyanexos/6281683N975.pdf>

- Pardo, J., Perdomo, M., & Benavides, J. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *NOVA*, 40-49.
- Paredes, M., & Yugsi, I. (Marzo de 2016). Identificación molecular de cepas de levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica aisladas de pitahaya (*Stenocereus queretaroensis* f.a.c Weber). *Universida Politécnica Salesiana*. Quito, Ecuador. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12145/1/UPS-QT09701.pdf>
- Pascual, R., & Venegas, S. (2015). LA MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO. PAPEL DE LOS MICROORGANISMOS. *Universidad de Granada*. Granada, España.
- Pazmiño, K. (Enero de 2013). Validación de los métodos de ensayo de sal en crudo, sedimentos por extracción y azufre en el petróleo crudo y sus derivados. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Pérez, B. (Mayo de 2006). Descripción de las características macroscópicas de cultivo in vitro de cepas de *Pleurotus* aisladas en Guatemala. *Universidad de San Carlos de Guatemala*. Guatemala, México. Obtenido de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2457.pdf
- Pernía, B., Demey, J., Inojosa, Y., & Naranjo, L. (2012). Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclastico de hongos aislados de crudo y sus derivados: un meta-análisis. *Latinoamerica de Biotecnología ambiental y algal*, 3.
- Petro, B., & Jiri, G. (09 de Enero de 2006). Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS MICROBIOLGY LETTERS*, 7.
- RAOHE 1215. (02 de 2001). *Decreto ejecutivo 1215*. Obtenido de <http://www.miliarium.com/paginas/leyes/internacional/Ecuador/Contaminacion/Decreto1215-01.pdf>
- Riesco, R. (2012). Proyecto de recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos. *Escuela Técnica Superios de Ingeniería*, 1-248.
- Rittmann, B., & McCarly, P. (2001). Biotecnología del medio ambiente. *McGraw-Hill, Inc.*, 20-24.
- Romero, A. (noviembre de 2013). Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales. Barcelona.
- Romero, M., Santamaría, D., & Zafra, C. (16 de Abril de 2009). *Bioingeniería y suelo: Abundancia microbiológica, pH y conductividad eléctrica bajo tres estratos de erosión*. Obtenido de [redalyc: http://www.redalyc.org/pdf/304/30415144008.pdf](http://www.redalyc.org/pdf/304/30415144008.pdf)

- Ron, K. (2012). *Determinación de residuos de hidrocarburos totales de petróleo (fracción diesel) en aguas de la Reserva de Producción Faunística Cuyabeno, mediante la técnica de cromatografía de gases de detector de ionización de llama*. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Rosales, L. (Diciembre de 2008). *Instituto Politécnico Nacional*. Obtenido de BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON ACEITE USADO DE AUTOMOVIL CON EL HONGO DE LA PUDRICIÓN BLANCA *Pleurotus ostreatus* (SETAS) EN DURANGO: <http://itzamna.bnct.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/3622/BIORROMEDIACIONESUELOS.pdf?sequence=1>
- Ruiz, L. (11 de 2007). *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Salmones, D., & Mata, G. (2015). Laccase production by *Pleurotus djamor* in agar media and during cultivation on wheat straw. *Revista mexicana de micología*.
- Sánchez, J., & Royse, D. (2001). *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* Chiapas: ECOSUR.
- Sepúlveda, T., & Velasco, J. (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. *Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT)*, 64. Obtenido de Tecnologías de remediación para suelos contaminados: <http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/372.pdf>
- Soberón, G. (2012). *Pseudomonas aeruginosa*. Recuperado el 10 de Abril de 2017, de microbios: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap3/>
- Trejos, M. (2017). Evaluación de un proceso de biorremediación aplicado a un suelo contaminado con petróleo crudo. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/59356/1/1124314851.2017.pdf>
- Trujillo, M., & Ramírez, J. (Diciembre de 2012). Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia. *Investigación Agraria y Ambiental*, 3(2), 26.
- TULAS, L. V. (2012). *Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados*. Obtenido de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/6078/39/LIBRO%20VI%20Anexo%20%20Remediacion%20de%20suelos.pdf>
- UGR. (9 de Mayo de 2005). *Microbiología general*. Obtenido de Nutrición microbiana: <https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/11nutrientes.htm>

- UNC. (2016). *FUNDAMENTOS Y TECNICAS PARA LA PRESERVACIÓN DE BACTERIAS, HONGOS Y LEVADURAS*. (U. N. Colombia, Ed.) Bogotá, Colombia: Instituto de Biotecnología. Obtenido de <http://www.ibun.unal.edu.co/lineasGrupos/GruposTransversales/doc/lineamientos.pdf>
- Válková, H. (2017). *Effect of bacteria on the degradation ability of Pleurotus ostreatus*. Obtenido de Sci Total Environment: <https://scihub.cc/10.1016/j.scitotenv.2017.01.171>
- Vallejo, J. P. (2015). Estabilización de suelos contaminados con hidrocarburos mediante el uso de materias silíceas. *Universidad Internacional SEK*, 16-17.
- Vanegas, K., Gutiérrez, P., & Marín, M. (12 de Diciembre de 2013). Identificación molecular de hongos aislados de tejidos de frijol con síntomas de antracnosis. *Universidad Nacional de Colombia*. Medellín, Colombia. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v19n2/v19n2a2.pdf>
- Varjani, S. J., Rana, D. P., Jain, A. K., Bateja, S., & Upasani, V. (2015). Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 116-124.
- Vilasó, J., Rodríguez, O., & Ábalos, A. (Diciembre de 2016). Extracción de petróleo en suelo contaminado empleando ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* ORA9. *Universidad de Oriente*, 28-36.

Anexos

Anexo 1. Tablas de criterios de calidad y remediación (TULAS)

Tabla 2
Criterios de Calidad de Suelo

Sustancia	Unidades (Concentración en Peso Seco)	Suelo
Parámetros Generales		
Conductividad	mmhos/cm	2
pH		6 a 8
Relación de Adsorción de Sodio (Índice SAR)		4*
Parámetros Inorgánicos		
Arsénico (inorgánico)	mg/kg	5
Azufre (elemental)	mg/kg	250
Bario	mg/kg	200
Boro (soluble en agua caliente)	mg/kg	1
Cadmio	mg/kg	0.5
Cobalto	mg/kg	10
Cobre	mg/kg	30
Cromo Total	mg/kg	20
Cromo VI	mg/kg	2.5
Cianuro (libre)	mg/kg	0.25
Estaño	mg/kg	5
Flúor (total)	mg/kg	200
Mercurio	mg/kg	0.1
Molibdeno	mg/kg	2
Níquel	mg/kg	20
Plomo	mg/kg	25
Selenio	mg/kg	1
Vanadio	mg/kg	25
Zinc	mg/kg	60
Parámetros Orgánicos		
Benceno	mg/kg	0.05
Clorobenceno	mg/kg	0.1
Etilbenceno	mg/kg	0.1
Estireno	mg/kg	0.1
Tolueno	mg/kg	0.1
Xileno	mg/kg	0.1
PCBs	mg/kg	0.1
Clorinados Alifáticos (cada tipo)	mg/kg	0.1
Clorobencenos (cada tipo)	mg/kg	0.05
Hexaclorobenceno	mg/kg	0.1
hexaclorociclohexano	mg/kg	0.01
Fenólicos no clorinados (cada tipo)	mg/kg	0.1
Clorofenoles (cada tipo)	mg/kg	0.05
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) cada tipo	mg/kg	0.1

*: El valor numérico del índice de Adsorción de Sodio (SAR) es la concentración requerida para que un suelo produzca todo tipo de cultivos. <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu112181.pdf>

TABLA 3

Criterios de Remediación o Restauración
(Valores Máximos Permitidos)

Sustancia	Unidades	USO DEL SUELO			
		Agrícola	Residencial	Comercial	Industrial
	(Concentración en Peso Seco)				
Parámetros Generales					
Conductividad	mmhos/cm.	2	2	4	4
pH		6 a 8	6 a 8	6 a 8	6 a 8
Parámetros Inorgánicos					
Arsénico (inorgánico)	mg/kg	12	15	15	15
Azufre (elemental)	mg/kg	500	-	-	-
Bario	mg/kg	750	500	2000	2000
Boro (soluble en agua caliente)	mg/kg	2	-	-	-
Cadmio	mg/kg	2	5	10	10
Cobalto	mg/kg	40	50	300	300
Cobre	mg/kg	63	63	91	91
Cromo Total	mg/kg	65	65	90	90
Cromo VI	mg/kg	0.4	0.4	1.4	1.4
Cianuro (libre)	mg/kg	0.9	0.9	8.0	8.0
Estaño	mg/kg	5	50	300	300
Flúor (total)	mg/kg	200	400	2000	2000
Mercurio (inorgánico)	mg/kg	0.8	2	10	10
Molibdeno	mg/kg	5	10	40	40
Níquel	mg/kg	50	100	100	100
Plata	mg/kg	20	20	40	40
Plomo	mg/kg	100	100	150	150
Selenio	mg/kg	2	3	10	10
Talio	mg/kg	1	1	1	1
Vanadio	mg/kg	130	130	130	130
Zinc	mg/kg	200	200	380	380
Parámetros orgánicos					
Aceites y Grasas	mg/kg	500	<2 500	<4 000	<4 000
Hidrocarburos Aromáticos Monocíclicos					
Benceno	mg/kg	0.05	0.5	5	5
Etilbenceno	mg/kg	0.1	1.2	20	20

Estireno	mg/kg	0.1	5	50	50
Tolueno	mg/kg	0.1	0.8	0.8	0.8
Xileno	mg/kg	0.1	1	17	20
Compuestos Fenólicos	mg/kg	-	-	-	-
Clorofenoles (cada uno)	mg/kg	0.05	0.5	5	5
Fenoles (total)	mg/kg	3.8	3.8	3.8	3.8
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	mg/kg	<2		<5	<1
Benzo(a)antraceno	mg/kg	0.1	1	1	1
Benzo(a)pirenos	mg/kg	0.1	0.7	0.7	0.7
Naftaleno	mg/kg	0.1	0.6	22	22
Pirenos	mg/kg	0.1	10	10	10
Hidrocarburos Clorinados					
Bifenilos policlorados (PCBs) total	mg/kg	0.5	1.3	33	33
Clorinados Alifáticos (cada uno)	mg/kg	0.1	5	50	50
Clorobencenos (cada uno)		0.05	2	10	10
Tetracloroetilenos	mg/kg	0.1	0.2	0.5	0.6
Tricloroetileno	mg/kg	0.1	3	30	30
Pesticidas					
Pesticidas organoclorados y sus Metabolitos totales*	mg/kg	0.1	0.1	0.1	0.1
Aldrin					
Dieldrin					
Clordano					
DDT(total) ¹					
Endosulfan (total) ²					
Endrin (total) ³	mg/kg	0.01	0.01	0.01	0.01
Heptacloro ⁴	mg/kg	0.01	0.01	0.01	0.01
Hexaclorociclohexano (todos los isómeros) ⁵	mg/kg	0.01	0.01	0.01	0.01
Atrazina	mg/kg	0.005	0.005	0.005	0.005
Carbofuran	mg/kg	0.01	0.01	0.01	0.01
Orgánicos Misceláneos		-	-	-	-
Alifáticos Clorinados (cada uno)	no mg/kg	0.3	-	-	-

Notas: n.d. no disponible

*: Total: La concentración total es la suma de la concentración de los constituyentes individuales de los pesticidas listados

1. - 4.4-DDT
- 4.4 DDE (p p'- DDX)

- 4,4-DDD (p,p'-TDE)
- 2. - a- endosulfan –Alfa
 - b- endosulfan- Beta
 - Sulfato de endosulfan
- 3. - endrin
 - Aldehido de endrin
- 4. - heptacloro
 - Epoxi- heptacloro
- 5. - a- BHC- Alfa
 - b- BHC- beta
 - r- BHC- (lindano)
 - g- BHC- Delta

Anexo 2. Fase de campo y análisis físico-químico

Coordenadas UTM		
Punto	Este	Norte
1	344601.98	9925330.07
2	344580.84	9925292.47
3	344580.85	9925271.46
4	344584.19	9925238.3
5	344587.54	9925216.18
6	344578.64	9925198.49
7	344605.36	9925159.8
8	344600.91	9925166.43
9	344595.36	9925098.99
10	344600.93	9925096.78
11	344597.6	9925080.19
12	344596.49	9925072.45
13	344593.15	9925048.13
14	344595.38	9925045.92
15	344590.93	9925049.23
16	344574.24	9925035.96
17	344570.37	9925300.54
18	344576.53	9925250.71
19	344602.12	9925145.38
20	344574.48	9925263.19

	Excavación del suelo
	Recolección de tierra
	Secado del suelo
	Filtración del suelo
	Equipos de absorción atómica

Elaborado por: Los autores, 2018

Anexo 3. Metodología análisis TPH´s suelos.

Este método proporciona condiciones de cromatografía de gases para la detección de compuestos orgánicos volátiles y semivolatos no halogenados.

Dependiendo de los analitos de interés, las muestras pueden ser introducidas en el GC por una variedad de técnicas, que incluyen:

- Purgar y atrapar (métodos 5030 o 5035)
- Espacio de cabeza de equilibrio (Método 5021)
- Inyección directa de muestras acuosas
- Inyección del concentrado de la destilación azeotrópica (Método 5031)
- Destilación al vacío (Método 5032)
- Después de la extracción con disolvente (Métodos 3510, 3520, 3535, 3540, 3541, 3545, 3546, 3550, 3560 u otra técnica apropiada)

Las muestras de aguas subterráneas o superficiales generalmente deben analizarse conjuntamente con Métodos 5021, 5030, 5031, 5032, 3510, 3520, u otros métodos preparatorios apropiados para obtener los límites de cuantificación necesarios. El método 3535 (extracción en fase sólida) también puede ser aplicable a algunos de los analitos objetivos, pero no ha sido validado por EPA junto con este método determinativo.

Las muestras que se analizarán para compuestos orgánicos de la gama de diesel pueden prepararse por un método de extracción con solvente. La materia orgánica del rango de gasolina puede introducirse en el GC / FID mediante purga y trampa (Métodos 5030 y 5035), espacio de cabeza automático (Método 5021), destilación al vacío (Método 5032), u otra técnica apropiada.

La trietilamina puede analizarse mediante inyección directa de muestras acuosas. Esta no se ha encontrado que el compuesto sea susceptible de técnicas de purga y trampa.

Una columna apropiada y un programa de temperatura se usan en el cromatógrafo de gases para separar los compuestos orgánicos. La detección se logra mediante un detector de ionización de llama (FID).

El método permite el uso de columnas empaquetadas o capilares para el análisis y confirmación de los analitos individuales no halogenados. Las columnas y condiciones de GC enumeradas tienen demostrado que proporciona la separación de esos analitos objetivos. Otras columnas y condiciones pueden ser empleado, siempre que el analista demuestre un rendimiento adecuado para el objetivo solicitud.

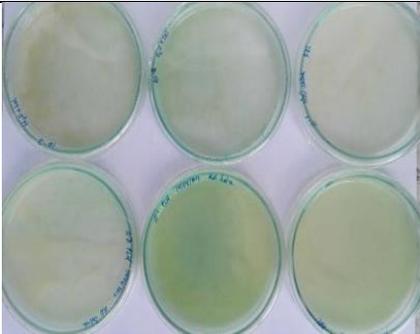
Los análisis cuantitativos de GRO y DRO se basan en las definiciones proporcionadas en Segundo. Dada la gran cantidad de componentes a separar, columnas capilares de sílice fundida son necesarios para el análisis de los hidrocarburos del petróleo, incluidos GRO y DRO, y son recomendado para todos los demás analitos. Una columna capilar también es necesaria para el análisis de trietilamina.

Anexo 4. Montaje del diseño experimental

	
<p>Construcción de cajas con plástico negro</p>	<p>Materiales para la mezcla.</p>
	
<p>Contaminación de petróleo en el suelo</p>	<p>Mezcla final del petróleo con la tierra</p>
	
<p>Colocación de 2kg de suelo contaminado en cada caja</p>	<p>Cajas colocadas al azar.</p>

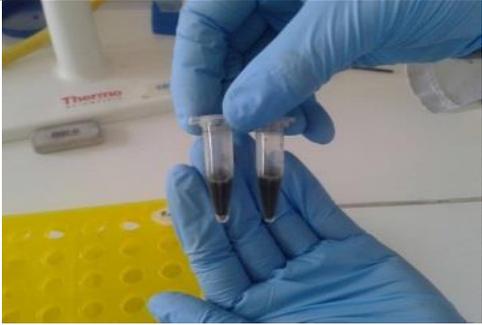
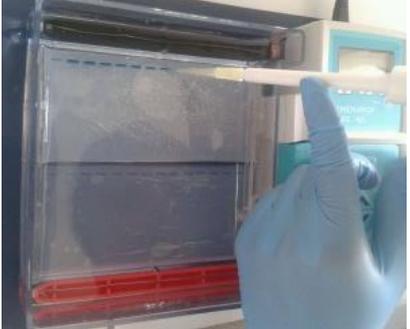
Elaborado por: Los autores, 2018

Anexo 5. Fase de laboratorio: Aislamiento e identificación de hongos y bacteria

	
<p>Preparación de solución madre</p>	<p>Homogenización de la solución madre</p>
	
<p>Disoluciones seriadas</p>	<p>Siembra de diluciones</p>
	
<p>Resiembra <i>Pleurotus ostreatus</i></p>	<p>Crecimiento de hongos</p>
	
<p>Crecimiento de bacteria</p>	<p>Tinción gram</p>

Elaborado por: Los autores, 2018

Anexo 6. Procedimiento de extracción de ADN

	
<p>Micelio de hongos para extracción ADN</p>	<p>Eppendorf con las muestras</p>
	
<p>Pelet con ADN</p>	<p>Electroforesis confirmación de ADN</p>
	
<p>Corrida de PCR para amplificación de ADN</p>	

Elaborado por: Los autores, 2018

Anexo 7. Metodología análisis físico químicos suelos.

NITRÓGENO TOTAL - MÉTODO DE KJELDAHL

Principio analítico

Mineralización ácida del nitrógeno en forma de amonio, destilación en medio alcalino y dosificación por volumetría (acidimetría).

Este método no es el apropiado cuando el suelo tiene una concentración de nitrógeno nítrico superior a 2 % del nitrógeno total. (Caso de una fertilización nitrogenada).

Procedimiento

Partir de una muestra de suelo tamizado a 0.5 mm perfectamente homogeneizada. Pesar 2 g de muestra muy precisamente, por medio de una balanza analítica. (1/10 de mg)

La pesada se efectuará en un cuadro de papel higiénico (aproximadamente 5*5 a fin de evitar que la muestra se adhiera a las paredes del matraz).

Cerrar después el papel, hacer una bola e introducirla dentro de un matraz de 800 mL. La numeración de la muestra debe ser puesta de manera clara e indeleble sobre el matraz.

Humedecer ligeramente la muestra con un chorro de piseta.

Agregar en el orden siguiente:

4 o 5 núcleos de ebullición. La función de estos núcleos es de asegurar unos movimientos de la muestra:

En el curso de la mineralización y así evitar puntos de sobrecalentamiento (así como en la destilación).

A los núcleos, los podemos reemplazar con piedra pómez.

0.5 g de hierro reducido, para tratar de reducir las pequeñas cantidades de nitratos que pueda contener la muestra,

2 gramos de catalizador,

20 mL de ácido sulfúrico concentrado (verter muy lentamente).

El catalizador, así como el hierro reducido serán puestos por medio de una medida, sin pesarles.

Homogeneizar y poner sobre la plancha de mineralización.

Poner en marcha el calentamiento dejándolo sobre la posición "LOW" hasta la decoloración completa de la solución, (entre dos y tres horas generalmente), después, pasar sobre la posición "3", por 30 minutos.

Tratar de no mover demasiado el matraz a fin de evitar "pegar" la muestra sobre las paredes (fuera del ácido) y así favorecer una sequedad de esta parte de muestra, lo que puede provocar unas pérdidas de nitrógeno.

En ningún caso la muestra debe llegar a sequedad.

En el caso de que se vea que la muestra pueda llegar a sequedad, apagar el calentador, dejar enfriar y agregar más ácido sulfúrico concentrado. Anotar el volumen agregado para no olvidar después tomar en cuenta este volumen cuando neutralizamos con la sosa.

Dejar enfriar durante la noche.

Agregar dentro del matraz alrededor de 450 a 500 mL de agua destilada y dejar enfriar 10 mn.

Un Erlenmeyer de 500 mL, con el número de la muestra correspondiente, que contenga 30 mL de ácido sulfúrico N/10, (medidos muy precisamente por medio de una bureta) y 5 o 6 gotas de "Rojo de Tashiro" debe estar puesto bajo el tubo de salida del refrigerante.

Ver que el tubo de salida del destilador esté completamente sumergido a fin de evitar las pérdidas por volatilización. Si es necesario, agregar agua destilada.

Para recoger el destilado, se puede reemplazar la solución de ácido sulfúrico N/10 por una de ácido bórico a 2 % en agua, alrededor de 25 mL, puestos por medio de un distribuidor automático. (En este caso la titulación se hace después con ácido sulfúrico N/10)

Adicionar en el matraz 100 mL de sosa 10 N, haciéndole fluir lentamente por las paredes del matraz sin mezclar. La sosa se deposita en el fondo del matraz.

Este volumen de 100 mL de sosa corresponde a un volumen de ácido sulfúrico de 20 mL, en el caso que agregamos más ácido durante la mineralización, es necesario aumentar el volumen de sosa 10 N a fin de obtener una buena neutralización del ácido. Si en teoría, 3.6 volúmenes de sosa 10 N neutralizan uno de ácido concentrado, prácticamente, es preferible agregar cinco volúmenes de sosa. (Generalmente, el ácido sulfúrico concentrado tiene una normalidad alrededor de 36 N)

Cuando se agrega la sosa, mantener el cuello del matraz alejado de la cara a fin de evitar un accidente por las salpicaduras en caso de mala manipulación.

Conectar el matraz al aparato de destilación y únicamente en este momento, agitar a fin de homogeneizar la solución.

La solución, una vez agitada, toma una coloración café oscuro, ocasionada por la precipitación de los hidróxidos formados por la agregación de la sosa.

Destilar de 280 a 300 mL. Verificar el fin de la destilación con ayuda de un papel indicador de pH (a la salida del tubo de destilación).

El pH debe estar neutro a ligeramente ácido, esto indica el fin de la destilación del amonio. (Antes de medir el pH, enjuagar el tubo de salida con un pequeño chorro de piseta)

Una vez llegado al volumen deseado o al pH satisfactorio, apagar el calentador y bajar el Erlenmeyer. Dejando pasar las últimas gotas del destilado.

Enjuagar bien el tubo de salida con un chorro de agua destilada antes de sacar el Erlenmeyer.

Poner en el lugar del Erlenmeyer retirado, un pequeño recipiente, (Erlenmeyer de 100 mL) lleno de agua destilada para el lavado del destilador.

Con la ayuda de una bureta de 25 o 50 mL, titular la solución recogida con la solución de hidróxido de sodio N/10. El viraje de color se hace del rojo al verde. Si es posible utilizar un agitador magnético para la agitación. En el caso de que trabajemos con una solución de ácido bórico para recoger el destilado, el viraje de color se hace del verde al rojo.

Controles

Para cada serie;

Un "blanco" que lleve todos los reactivos utilizados.

Un testigo constituido por una muestra, o una sal, de concentración conocida.

Una muestra preparada por duplicado.

FÓSFORO TOTAL - Colorimetría por el método de Duval

Principio analítico

Dstrucción de la materia orgánica en la mufla, ataque con ácido nítrico. Después del ataque, el ácido nítrico será eliminado por evaporación. El fósforo recogido con el ácido sulfúrico se determina por colorimetría según el método de Duval.

Procedimiento

Partir de una muestra de suelo tamizada a 0.5 mm, perfectamente homogeneizada.

1-Extracción

Pesar muy precisamente 0.2 g de la muestra (al 1/10 de mg) directamente en un vaso de 100 mL, que le lleva el número de la muestra.

Poner el número con un lápiz de papel a fin de evitar se borre la numeración de la mufla.

Agregar 4 mL de la solución de nitrato de magnesio. (Con una pipeta)

Introducir en la estufa a 60 °C o 70 °C hasta desecación completa de la muestra (generalmente una noche, es preferible ir lentamente a fin evitar las salpicaduras en el caso de un calentamiento demasiado rápido).

Introducir en la mufla FRIA.

Subir la temperatura hasta 46 °C, dejando la puerta entreabierta. (Eso favorece una mejor combustión) El tiempo ideal de subida del calentamiento se encuentra alrededor de hora y media. Calentar muy rápidamente puede provocar salpicaduras y así pérdidas de muestras.

Una vez llegado a 46 °C. Cerrar la puerta y mantener a esa temperatura una hora.

No dejar pasar de 50 °C a fin de evitar las pérdidas de algunas formas del fósforo por volatilización.

Dejar enfriar y sacar de la mufla.

Agregar 20 mL de ácido nítrico concentrado por medio de una probeta y cubrir con un vidrio de reloj.

Dejar así una noche.

Poner en la plancha eléctrica a una temperatura ligeramente inferior al punto de ebullición durante 3 o 4 horas.

Sacar el vidrio de reloj, y llevar a sequedad muy lentamente a fin de evitar las pérdidas por salpicaduras. (Generalmente entre una hora y una hora y media)

Una vez secado, agregar por medio de una probeta, 20 mL de ácido sulfúrico 0.5 N, cubrir de nuevo con un vidrio de reloj y llevar a ebullición suave durante ¼ de hora.

Disminuir el calor, sacar el vidrio de reloj y reducir, muy suavemente, la solución hasta un volumen alrededor de 1.5 a 2 mL, (aparición de vapores blancos)

En ningún caso, llevar a sequedad, (en el caso contrario, se tendrá pérdidas de fósforo)

Dejar enfriar y agregar 20 mL de agua destilada.

Cubrir con un vidrio de reloj, y llevar a ebullición durante 5 mn.

Dejar enfriar

Preparar un embudo con un filtro arriba de un balón aforado de 100 mL

Filtrar

Enjuagar perfectamente el vaso con agua destilada, ayudarse con un “policía” para restregar las paredes del vaso.

Lavar el filtro por medio de pequeños chorros de agua destilada, dejar escurrir bien entre dos lavados. Proceder con movimientos circulares del exterior al interior.

Continuar así hasta llegar a un volumen cerca a los 100 mL

Aforar a 100 mL en forma muy precisa con agua destilada.

Tapar y homogenizar cuidadosamente por volteadas sucesivas.

2.-Dilución

Diluir la solución de extracción de manera que la lectura se sitúe dentro de la gama, a decir, entre 0.2 y 1.2 ppm de fósforo. Generalmente una dilución de 1 en 4 es satisfactoria.

Se debe tratar de trabajar en series de muestras que provienen de un lugar similar, así podemos pensar que estarán dentro de un mismo rango, una vez que la extracción está terminada, (filtración y aforado), tomar una muestra de la serie para probar la dilución standard 1/4, y seguir el procedimiento de desarrollo del color.

Probar si visualmente la coloración obtenida se situó dentro de la gama. Si es así diluir de la misma manera toda la serie. En el caso contrario, adoptar una nueva dilución que se ajuste al rango.

Caso de la dilución generalmente utilizada, 1/4

Tomar en forma muy precisa, 25 mL de la solución por medio de una pipeta volumétrica de 25 mL y pasarles en un balón aforado de 100 mL completar y aforar muy precisamente con agua destilada, anotar el número de la muestra en el balón, así como la dilución.

3.- Lectura

Verter un poco de la solución diluida en un vaso plástico de 50 mL, enjuagar bien y botar. Después, verter de nuevo alrededor de 20 mL de la solución en este vaso.

Eso para poder utilizar una pipeta automática que no pasa por el cuello de los balones de 100 mL.

Tomar 10 mL de la solución diluida por medio de la pipeta automática perfectamente arreglada a 10 introducirla en un tubo de ensayo que lleva la numeración de la muestra y la dilución.

Adicionar 4 mL de ácido ascórbico al 1 % por medio de la pipeta automática de 5 ml arreglada a 4 mL y 2 mL de solución sulfo-molibdica con el distribuidor automático.

Agitar cada tubo alrededor de 5 segundos sobre el agitador.

Colocar en un baño de María 15 mn a 70 °C a fin de desarrollar la coloración (azul). La coloración se queda estable durante 2 o 3 horas.

Prender el baño de María una hora antes de esta operación, a fin de llegar a la temperatura deseada una vez que las muestras estén listas para pasarlas.

Dejar enfriar en un baño de agua fría por un tiempo de 5 mn.

Preparar de manera idéntica a la gama patrón. Operar de manera muy precisa para la tomada de los diferentes volúmenes. Una gama mal hecha dará como resultado una serie completamente dañada.

Pasar las muestras a los tubos de colorimetría, verificando la perfecta limpieza de estos tubos.

Efectuar la lectura en un colorímetro a 660 nm de la siguiente manera:

El colorímetro debe estar prendido por lo menos una hora antes de la lectura para que esté bien caliente.

Arreglar el cero por medio del botón adecuado.

Pasar la solución "blanco" y ajustar el ciento por ciento de transmisión por medio de ajustes del botón indicador de 100 % de transmitancia.

Pasar los puntos de la gama, del más bajo al más alto, anotando la lectura obtenida por cada punto.

Pasar de nuevo el "blanco", si la lectura ha cambiado ajustarlo y pasar de nuevo la gama.

Pasar ahora las muestras y anotar las lecturas obtenidas.

Llegado al medio de la serie, pasar de nuevo el punto de 0.8 ppm de la gama a fin de verificar la buena calibración del colorímetro.

CATIONES DE CAMBIO Ca, Mg, K, Na

Extracción con acetato de amonio a un pH 7

Principio analítico

Desplazamiento de los cationes de cambio del complejo de adsorción por el amonio de una solución salina a pH neutro (acetato de amonio uno normal).

De terminación efectuada por espectrofotometría de absorción atómica.

Procedimiento

1.- Extracción

Partir de una muestra de suelo tamizado a 0.5 mm perfectamente homogeneizada.

Pesar 5 g de suelo lo más precisamente posible en la balanza de precisión (a 1 mg), con varias tomas. (Nunca pesar los 5 g de una sola tomada). La pesada se efectuará directamente en un vaso de 100 mL. (Inscribir de manera indeleble el número de la muestra sobre este vaso).

Agregar 50 mL de esta solución extractora (acetato de amonio).

Mezclar bien con una varilla de vidrio.

Dejar en contacto durante 18 horas. Lo ideal es poner en contacto a las 14 horas y agitar 2 o 3 veces la solución antes de dejar el laboratorio (15h30).

Instalar el embudo con su filtro arriba de un balón aforado de 100 mL, marcando el número de la muestra.

Después de las 18 horas de contacto, verter la solución sobrenadante sobre el filtro sin hacer pasar el suelo. Para evitar el salpique, ayudarse con la varilla de vidrio.

Agregar en el vaso alrededor de 20 mL de solución extractora, agitar con la varilla de vidrio y dejar en contacto una hora.

Filtrar, depositando el suelo sobre el filtro.

Enjuagar bien el vaso que ha servido para la extracción, por medio de una piseta que contenga la solución de extracción, manteniéndolo encima del filtro.

Dejar escurrir completamente el suelo y lavar el filtro por medio de pequeños chorros de la solución de extracción (con la piseta), dejando escurrir bien entre dos lavados, (proceder con movimientos circulares, del exterior al interior, reuniendo el suelo en la parte baja del filtro)

Continuar así hasta llegar a un volumen ligeramente inferior a 100 mL (alrededor de 2 a 3 mm bajo la línea de aforo)

Sacar el balón y aforarlo muy precisamente con la solución extractora (o agua destilada) por medio de una "mini piseta".

Atención: Cuidar de no poner los dedos en contacto con la solución extractora o con las tapas utilizadas para el cierre de los balones. (Contaminación por el sodio).

2 - Dosificación

2.a- Dilución

A partir de la solución precedente, efectuar una dilución a 100 como sigue:

Poner delante de cada balón de 100 mL un vaso de plástico de 50 mL con el número de la muestra. (En el caso de que se trabaje con muestras para investigación: no proceder a estas operaciones porque la medida del volumen a tomar se hace por medio de una pipeta volumétrica de 1 mL, eso con el fin de tener una mayor precisión)

Enjuagar este vaso con un poco de la solución contenida dentro del balón.

Verter después alrededor de 20 mL de esta solución en el vaso.

Con la ayuda de la pipeta automática de 5 mL, previamente regulada a 1 mL, tomar 1 mL de la solución y pasarla a un balón aforado de 100 mL numerado, conteniendo 5 mL de la solución de óxido de lantano a 1 %. (Introducir esta solución con la ayuda de un distribuidor automático arreglado a 5 mL) (para una precisión más grande, es preferible trabajar con pipetas automáticas de volumen fijo)

Completar con agua destilada y aforar muy precisamente a 100 mL.

Tapar el balón y homogeneizar cuidadosamente por volteadas sucesivas.

2.b Preparación del espectrofotómetro

Al llegar al laboratorio en la mañana, conectar el espectrofotómetro y poner las lámparas en contacto, (ver la tabla adjunta sobre corriente). No pasar bruscamente a la intensidad máxima, esperar alrededor de 5 segundos entre cada aumento de corriente. Una lectura de buena calidad demanda por lo menos 4 horas de estabilización para la parte electrónica y alrededor de 20 mn para las lámparas.

2.ba Encendido

Operaciones a efectuar en el siguiente orden:

Llevar la longitud de onda del aparato sobre la correspondiente del elemento que se va a leer (revisar la tabla para el elemento indicado).

Ajustar el ancho y la banda

Abrir la trampa del mechero y llenarla con agua destilada.

Poner un vaso plástico con agua destilada (fresca) bajo el tubo de aspiración del mechero.

Verificar la buena ubicación del mechero de acuerdo a la luz emitida por la lámpara.

Pasar sobre "simple haz" y buscar la señal máxima manipulando los tornillos de reglaje de la lámpara y pasar de nuevo sobre "doble haz"

Pasar sobre la posición "concentración".

Conectar el compresor de aire.

Verificar que esté cerrado el manómetro de la botella de acetileno.

Abrir la llave de la botella de acetileno una media vuelta solamente.

Abrir el manómetro del acetileno y llevarlo a una presión alrededor de 1 kg (cuidado de no pasar esta presión)

Cuando la señal luminosa del aparato indica "READY" encender la llama.

2.bb Calibración

Efectuar la calibración del aparato por medio de la gama de patrones. (esta debe sacarse de la refrigeradora una hora antes de la lectura, de manera que esté a la temperatura ambiente para su utilización).

Dejar la llama en funcionamiento durante 3 o 4 minutos antes de la calibración.

Regular las presiones del aire y del acetileno (entre 57 y 39 para el aire, 10 para el acetileno). En ciertos casos, es necesario disminuir la presión del aire y aumentar la del acetileno, a fin de facilitar el encendido de la llama, llevar después a las presiones arriba indicadas.

Fijar el cero del aparato con agua destilada. Las pruebas efectuadas mostraron que para esta determinación no es necesario utilizar la solución extractora para fijar el cero.

Escoger 3 puntos del medio de la gama de patrones y entrarlos sucesivamente del más bajo al más alto, recalibrando el cero entre cada punto.

El espectrofotómetro está listo.

2c-lectura

Introducir el tubo de aspiración dentro del balón que contiene la muestra a dosificar, esperar la estabilización de la lectura (alrededor de 7 segundos) y anotar la lectura obtenida.

El resultado leído debe situarse dentro de los dos primeros tercios de la curva de estandarización. En el caso contrario, cambiar de gama de patrones a fin de

“encuadrar” la muestra, o bien cambiar la dilución de la muestra.

Preparación de la gama patrón

El material utilizado para la preparación de la gama debe estar exento de toda contaminación. Jamás lavarlo con detergente. Siempre utilizar una solución sulfocrómica, después enjuagar abundantemente con agua destilada (además, en el caso de las buretas, antes de la utilización, enjuagar dos veces con la solución a medir)

Utilizar las soluciones estándares (stock) a 1000 ppm de Ca, Mg, K, Na, para espectrofotometría.

A partir de estas soluciones, preparar sucesivamente soluciones a 500, 100, 10 y 1 ppm como sigue para cada elemento:

Solución a 500 ppm:

Poner 50 mL de la solución "stock", por medio de una bureta de 50 mL, en un balón aforado de 100 mL.

Completar y aforar muy precisamente con agua destilada.

Solución a 100 ppm:

Poner 20 mL de la solución de 500 ppm en un balón aforado de 100 mL por medio de una bureta de 25 mL.

Completar y aforar muy precisamente con agua destilada.

Solución a 10 ppm:

Poner 10 mL de la solución de 100 ppm en un balón aforado de 100 mL por medio de una bureta de 10 mL completar y aforar muy precisamente con agua destilada.

Solución a 1 ppm:

Poner 10 mL de la solución de 10 ppm en un balón aforado de 100 mL por medio de una bureta de 10 mL, completar y aforar muy precisamente con agua destilada.

Gama patrón “compleja” a confeccionar

	1	2	3	4	5	6	7
Ca	0,1	0.2	0.6	1.0	2.0	3.0	5.0 ppm
Mg	0.5	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0 ppm
K	0.06	0.1	0.12	0.5	1.0	1.2	1.5 ppm
Na	0.04	0.08	0.1	0.2	0.4	0.8	1.0ppm

Procedimiento

Para una mejor comprensión, las soluciones de 10 y de 1 ppm serán en adelante designadas así:

Solución A para 10 ppm.

Solución B para 1 ppm.

(en el caso del calcio, se tendrá una solución C, correspondiente a 100 ppm).

Tomar 7 balones aforados de 100 mL, perfectamente limpios.

Inscribir CC (cationes de cambio) sobre cada balón y numerarles de 1 a 7 de manera bien clara a fin de evitar los errores.

Preparar 2 buretas de 10 mL, que deberán contener, una, la solución A, y otra, la solución B del elemento a verter. (Una tercera con la solución C para el calcio).

Volúmenes a verter:

	Ca	Mg	K	Na
1	B. 10 mL	B. 05 mL	B.06 mL	B. 04 mL
2	B. 20 mL	B. 10 mL	B.10 mL	B. 08 mL
3	A. 06 mL	B. 20 mL	B. 20 mL	B. 10 mL
4	A. 10 mL	A. 04 mL	A. 05 mL	B. 20 mL
5	A. 20 mL	A .06 mL	A. 10 mL	A. 04 mL
6	C. 03 mL	A. 08 mL	A. 12 mL	A. 08 mL
7	C. 05 mL	A. 10 mL	A. 15 mL	A. 10 mL

Agregar en cada balón 1 mL de solución de acetato de amonio normal a pH 7 (a fin de estar en el mismo medio que las muestras a dosificar), y 5 mL de la solución de óxido de lantano a 1 %, aforar a 100 mL de manera muy precisa y homogeneizar perfectamente.

La gama patrón siempre debe estar conservada en la refrigeradora.

Límites de lectura del espectrofotómetro:

Ca. de 0.01 a 5 ppm.

Mg. de 0.03 a 1 ppm.

K. de 0.03 a 2 ppm.

Na. de 0.03 a 1.5 ppm.

Controles

Para cada serie:

Una muestra preparada por duplicado.

Un testigo constituido por una muestra de valor conocido.

Cálculos

Los resultados están expresados en mili equivalentes por 100 g de suelo seco al aire.

Para 5 g de suelo en 100 ml de solución extractora.

Multiplicar los resultados obtenidos en la lectura por los siguientes factores,

1- Dilución de uno en cien; (1/100)

Ca: 5.0

Mg: 16.4

K: 5.1

Na: 8.7

2- Dilución de dos en cien; (1/50)

Ca: 2.5

Mg: 8.2

K: 2,55

Na: 4,35

Notas

En el caso de que se encuentre en presencia de un suelo calcáreo, la lectura obtenida para el calcio no tiene mayor significación, porque, además del calcio de cambio, se determina también una cierta cantidad de calcio correspondiente a los carbonatos disueltos por la solución extractora. Además, la relación entre la capacidad de intercambio y el total de los cationes tampoco tiene significación.

Generalmente, se puede considerar la diferencia entre la capacidad de intercambio y la suma del K, Na y Mg como una aproximación del valor del calcio.

Los tres métodos abajo indicados permiten más o menos obtener un valor aproximado del calcio.

1- Extracción a un pH 8.2

Este método utiliza una solución de acetato de amonio con un pH cercano al de un suelo calcáreo, la disolución de los carbonatos se restringe considerablemente. (en teoría)

2- Doble extracción.

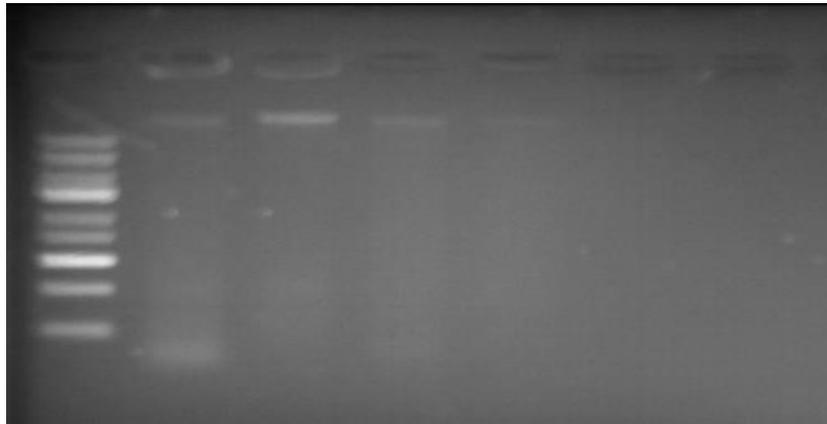
Con dos extracciones consecutivas con acetato de amonio pH 7, extraemos, en la primera el calcio de cambio más el calcio de los carbonatos disueltos y en la segunda, únicamente (por lo menos, teóricamente) el calcio de los carbonatos disueltos.

La diferencia entre los dos resultados puede ser considerada como un valor cercano al contenido real de la muestra en calcio de cambio.

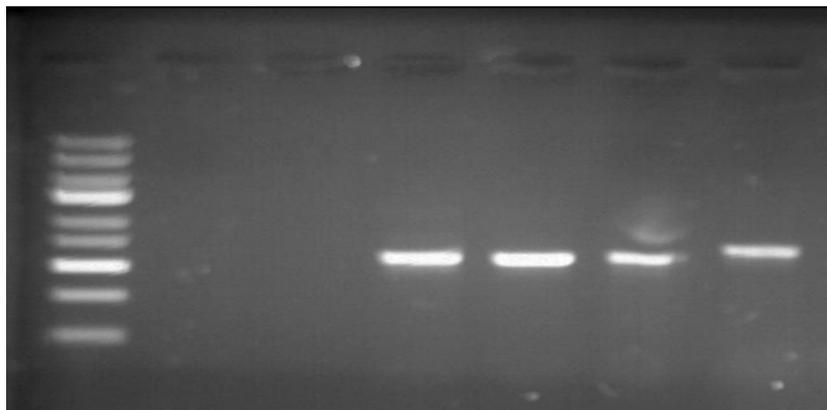
3- Extracción con acetato de amonio en medio alcohólico.

Se puede pensar que los carbonatos no son solubles en el alcohol, o por lo menos de manera muy débil, pero los resultados obtenidos con los primeros ensayos no parecen completamente satisfactorios, y deben estar comprobados ulteriormente.

Anexo 8. Identificación molecular de hongos (electroforesis horizontal).



Electroforesis de extracción de ADN (hongos)
de izquierda a derecha se observa 1. Control positivo 2. AN1 3. AN2 4. PO1
5. PO2



Electroforesis de amplificación de región ITS (hongos)
de izquierda a derecha se observa 1. Control positivo 2. Sin muestra 3. sin
muestra 4. AN1 5. AN2 6. PO1 7. PO2

Anexo 9. Análisis físicos del suelo (inicio y final del proyecto)

a. Análisis iniciales



LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Ciente: LAURA ELIZABETH HUACHI ESPÍN

Dirección: Av. Isabel La Católica N. 23-52 y Madrid

Contacto: Tania Cevallos

Cantidad de muestras: 1

Fecha de Ingreso: Junio 05, 2017

Código de Laboratorio: SA17-467

Teléfono: 23962-900

E-mail: huachi@ups.edu.ec

Tipo de Muestra: Sustrato

Fecha Emisión: Enero 17, 2018

Fecha de Análisis: Enero 03 al 12, 2017

Identificación de Usuario:

SUELO ORIENTE

Nº de Informe: 18020

INFORME DE RESULTADOS

Nitrógeno*	Fósforo	Potasio	Calcio	Magnesio	Sodio	Azufre	Hierro	Manganeso	Cobre	Zinc	Boro
%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	ppm/100g	ppm/100g	ppm/100g	ppm/100g	ppm/100g
0,28	0,27	0,04	0,56	0,49	0,05	0,13	38535	453,80	179,83	1305,20	133,82

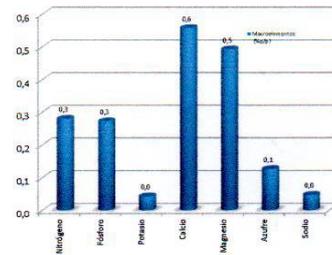


Gráfico 2.- Contenido de macroelementos

Método de análisis:
P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn - Colorimetría, Fotometría de Flama y Absorción Atómica;
*N- Kjeldahl;
Simbología:
ppm/100g: partes por millón en cien gramos de muestra;
%: porcentaje

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

La muestra fue analizada posterior a la incubación y tratada con agentes ácidos de acuerdo al protocolo LSA

Ing. Agr. Orlando Cevallos
Técnico de Suelos y Agua

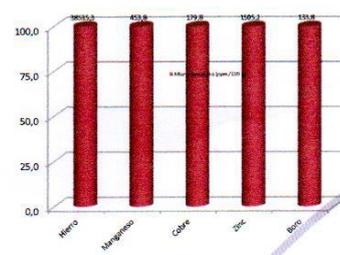


Gráfico 1.- Contenido de microelementos

Datos Complementarios:
Cenizas 90,2 %
Materia orgánica 9,8 %

Quím. De Alm. Tania Simbana
Responsable de Laboratorio

Pág. 1 de 1



Laboratorio de suelos y de agua

LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N3-85 y 9 de Octubre. Teléfonos: 593 (2) 3962946 / 3962800 ext. 2504-2534.
Correo electrónico: ogualavisi@ups.edu.ec / bioagrolab@ups.edu.ec

b. Análisis finales



LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Ciente: LAURA ELIZABETH HUACHI ESPÍN

Dirección: Av. Isabel La Católica N. 23-52 y Madrid

Contacto: Tania Cevallos

Cantidad de muestras: 1

Fecha de Ingreso: Diciembre 01, 2017

Código de Laboratorio: SA18-016

Identificación de Usuario:

TCH

Teléfono: 23962-900

E-mail: lhuchi@ups.edu.ec

Tipo de Muestra: Sustrato

Fecha Emisión: Enero 17, 2018

Fecha de Análisis: Enero 03 al 12, 2018

Nº de Informe: 18021

INFORME DE RESULTADOS

Nitrogeno *	Fosforo	Potasio	Calcio	Magnesio	Sodio	Azufre	Hierro	Manganeso	Cobre	Zinc	Boro
%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	ppm/100g	ppm/100g	ppm/100g	ppm/100g	ppm/100g
1,28	0,08	0,05	0,47	0,28	0,08	0,06	15844	171,53	37,13	1715,51	90,25

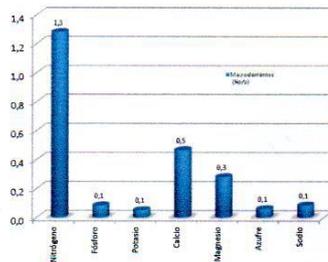


Gráfico 2 - Contenido de macroelementos

Método de análisis:
P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn - Colorimetría, Fotometría de Flama y Absorción Atómica,
*N- Kjeldahl.

Simbología:
ppm/100g: partes por millón en cien gramos de muestra,
%: porcentaje

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

La muestra fue analizada posterior a la incineración y tratada con agentes ácidos de acuerdo al protocolo ISA

[Firma]
Ing. Agr. Orlando Aguilar
Técnico de Suelos y Agua

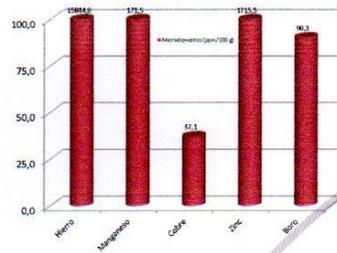


Gráfico 1 - Contenido de microelementos

Datos Complementarios:

Cenizas	81,6	%
Materia orgánica	18,4	%

[Firma]
Quím. De Alim. Paola Simbaña
Responsable de Laboratorio



LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N3-85 y 9 de Octubre. Teléfonos: 593 (2) 3962946 / 3962800 ext. 2504-2534.
Correo electrónico: ogualavisi@ups.edu.ec / bioagrolab@ups.edu.ec

Anexo 10. Análisis de TPH's

a. Análisis de TPH's inicial



REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA
DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Ing. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo

Muestra Recibida: 19-jul-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 31-jul-17

Número reporte Gruentec: 1707268-S001

Rotulación Muestra:	MUESTRA 1	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	08-jul-17	
No. Reporte Gruentec:	1707268-S001	
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco:		
Acenaftaleno mg/kg *	8.2*	EPA 8270 D / MM-S-22
Acenafteno mg/kg *	<0.5	EPA 8270 D / MM-S-22
Antraceno mg/kg *	<0.5	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)antraceno mg/kg ^(1,2)	7.3*	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(b)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(g,h,i)perileno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(k)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Criseno mg/kg ^(1,2)	1.3	EPA 8270 D / MM-S-22
Dibenzo(a,h)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fenantreno mg/kg ^(1,2)	32*	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoreno mg/kg *	<0.5	EPA 8270 D / MM-S-22
Indeno(1,2,3 c,d) pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Naftaleno mg/kg *	65*	EPA 8270 D / MM-S-22
Pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Parámetros Orgánicos en peso seco:		
Hidrocarburos Totales de petróleo (C8-C40) mg/kg ^(1,2)	104231	EPA 8015 D / MM-S-23

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

INCERTIDUMBRE (U):

HAP Suelo = 30%; TPH suelo = 30%

Cálculo: $C \pm (U \times C / 100)$ en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.

Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Página 1 de 1

San Juan de Cumbayá - Eloy Alfaro S7-157 y Belisario Quevedo, P.O. Box 17-22-20064 Quito - Ecuador
Telfs: 601- 4371 / 603 - 9221/ 600 - 5273 - E-mail: info@gruentec.com - www.gruentec.com

b. Análisis de TPH's de cada tratamiento



REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 2

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712393-S001

Rotulación Muestra:	ENSAYO 2 TRATAMIENTO 1 REP 1	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1712393-S001	
Parámetros Orgánicos en peso seco:		
Hidrocarburos Totales de petróleo (C8-C40) mg/kg ^(1,2)	71086 ⁽ⁿ⁾	EPA 8015 D / MM-S-23

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

o) Se realizó dilución 10X a la muestra, muestra con olor a hidrocarburo y cromatograma definido

INCERTIDUMBRE (U):

Humedad = 5%; TPH suelo = 25%

Cálculo: C +/- (UxC/100) en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.

Ing. Isabel Estrella
Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.



REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 2

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712393-S002

Rotulación Muestra:	ENSAYO 2 TRATAMIENTO 1 REP 2	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1712393-S002	
Parámetros Orgánicos en peso seco:		
Hidrocarburos Totales de petróleo (C8-C40) mg/kg ^(1,2)	97114 ^{o) n)}	EPA 8015 D / MM-S-23

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

o) Se realizó dilución 10X a la muestra, muestra con olor a hidrocarburo y cromatograma definido

INCERTIDUMBRE (U):

Humedad = 5%; TPH suelo = 25%

Cálculo: C +/- (UxC/100) en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.



Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 2

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712393-S003

Rotulación Muestra:	ENSAYO 2 TRATAMIENTO 1 REP 3	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1712393-S003	
Parámetros Orgánicos en peso seco:		
Hidrocarburos Totales de petróleo (C8-C40) mg/kg ^(1,2)	102349 ^{o) n)}	EPA 8015 D / MM-S-23

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

o) Se realizó dilución 10X a la muestra, muestra con olor a hidrocarburo y cromatograma definido

INCERTIDUMBRE (U):

Humedad = 5%; TPH suelo = 25%

Cálculo: C +/- (UxC/100) en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.



Ing. Isabel Estrella
Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Página 1 de 1



Acreditación N° OAE LE 2C 05-008
LABORATORIO DE ENSAYOS

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 2

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712393-S004

Rotulación Muestra:	ENSAYO 2 TRATAMIENTO 2 REP 1	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1712393-S004	
Parámetros Orgánicos en peso seco:		
Hidrocarburos Totales de petróleo (C8-C40) mg/kg ^(1,2)	98632 ^{o) n)}	EPA 8015 D / MM-S-23

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

o) Se realizó dilución 10X a la muestra, muestra con olor a hidrocarburo y cromatograma definido

INCERTIDUMBRE (U):

Humedad = 5%; TPH suelo = 25%

Cálculo: C +/- (UxC/100) en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.



Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Página 1 de 1

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf. 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 2

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712393-S005

Rotulación Muestra:	ENSAYO 2 TRATAMIENTO 2 REP 2	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1712393-S005	
Parámetros Orgánicos en peso seco:		
Hidrocarburos Totales de petróleo (C8-C40) mg/kg ^(1,2)	84945 ^{o) n)}	EPA 8015 D / MM-S-23

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

o) Se realizó dilución 10X a la muestra, muestra con olor a hidrocarburo y cromatograma definido

INCERTIDUMBRE (U):

Humedad = 5%; TPH suelo = 25%

Cálculo: C +/- (UxC/100) en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.



Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 2

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712393-S006

Rotulación Muestra:	ENSAYO 2 TRATAMIENTO 2 REP 3	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1712393-S006	
Parámetros Orgánicos en peso seco:		
Hidrocarburos Totales de petróleo (C8-C40) mg/kg ^(1,2)	70589 ^{o) n)}	EPA 8015 D / MM-S-23

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

o) Se realizó dilución 10X a la muestra, muestra con olor a hidrocarburo y cromatograma definido

INCERTIDUMBRE (U):

Humedad = 5%; TPH suelo = 25%

Cálculo: C +/- (UxC/100) en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.



Ing. Isabel Estrella
Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Página 1 de 1



REPORTE DE ANÁLISIS

Ciente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 2

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712393-S007

Rotulación Muestra:	ENSAYO 2 TRATAMIENTO 3 REP 1	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1712393-S007	
Parámetros Orgánicos en peso seco:		
Hidrocarburos Totales de petróleo (C8-C40) mg/kg ^(1,2)	70772 ^{o) n)}	EPA 8015 D / MM-S-23

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

o) Se realizó dilución 10X a la muestra, muestra con olor a hidrocarburo y cromatograma definido

INCERTIDUMBRE (U):

Humedad = 5%; TPH suelo = 25%

Cálculo: C +/- (UxC/100) en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.

Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Página 1 de 1



Servicio de Acreditación Ecuatoriano
Acreditación N° OAE LE 2C 05-008
LABORATORIO DE ENSAYOS

REPORTE DE ANÁLISIS

Ciente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 2

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712393-S008

Rotulación Muestra:	ENSAYO 2 TRATAMIENTO 3 REP 2	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1712393-S008	
Parámetros Orgánicos en peso seco:		
Hidrocarburos Totales de petróleo (C8-C40) mg/kg ^(1,2)	102889 ^{o) n)}	EPA 8015 D / MM-S-23

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d. fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

o) Se realizó dilución 10X a la muestra, muestra con olor a hidrocarburo y cromatograma definido

INCERTIDUMBRE (U):

Humedad = 5%; TPH suelo = 25%

Cálculo: C +/- (UxC/100) en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.

Ing. Isabel Estrella
Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.



Acreditación N° OAE LE 2C 05-008
LABORATORIO DE ENSAYOS

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 2

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712393-S009

Rotulación Muestra:	ENSAYO 2 TRATAMIENTO 3 REP 3	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1712393-S009	
Parámetros Orgánicos en peso seco:		
Hidrocarburos Totales de petróleo (C8-C40) mg/kg ^(1,2)	106495 ^{o) n)}	EPA 8015 D / MM-S-23

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

o) Se realizó dilución 10X a la muestra, muestra con olor a hidrocarburo y cromatograma definido

INCERTIDUMBRE (U):

Humedad = 5%; TPH suelo = 25%

Cálculo: C +/- (UxC/100) en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.



Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Página 1 de 1

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 2

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712393-S010

Rotulación Muestra:	ENSAYO 2 TRATAMIENTO 4 REP 1	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1712393-S010	
Parámetros Orgánicos en peso seco:		
Hidrocarburos Totales de petróleo (C8-C40) mg/kg ^(1,2)	44499 ^{p) n)}	EPA 8015 D / MM-S-23

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

p) Muestra con olor a hidrocarburo y cromatograma definido

INCERTIDUMBRE (U):

Humedad = 5%; TPH suelo = 25%

Cálculo: $C \pm U$ (UxC/100) en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.



Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.



REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 2

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712393-S011

Rotulación Muestra:	ENSAYO 2 TRATAMIENTO 4 REP 2	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1712393-S011	
Parámetros Orgánicos en peso seco:		
Hidrocarburos Totales de petróleo (C8-C40) mg/kg ^(1,2)	69409 ^{o) n)}	EPA 8015 D / MM-S-23

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

o) Se realizó dilución 10X a la muestra, muestra con olor a hidrocarburo y cromatograma definido

INCERTIDUMBRE (U):

Humedad = 5%; TPH suelo = 25%

Cálculo: $C \pm (U \times C/100)$ en donde: C=valor medido; U= Incertidumbre %.

Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.



REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 2

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712393-S012

Rotulación Muestra:	ENSAYO 2 TRATAMIENTO 4 REP 3	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1712393-S012	
Parámetros Orgánicos en peso seco:		
Hidrocarburos Totales de petróleo (C8-C40) mg/kg ^(1,2)	66561 ^{o) n)}	EPA 8015 D / MM-S-23

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

o) Se realizó dilución 10X a la muestra, muestra con olor a hidrocarburo y cromatograma definido

INCERTIDUMBRE (U):

Humedad = 5%; TPH suelo = 25%

Cálculo: $C \pm (U \times C/100)$ en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.



Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.



REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 2

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712393-S013

Rotulación Muestra:	ENSAYO 2 TRATAMIENTO 5 REP 1	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1712393-S013	
Parámetros Orgánicos en peso seco:		
Hidrocarburos Totales de petróleo (C8-C40) mg/kg ^(1,2)	66629 ^{o) n)}	EPA 8015 D / MM-S-23

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

o) Se realizó dilución 10X a la muestra, muestra con olor a hidrocarburo y cromatograma definido

INCERTIDUMBRE (U):

Humedad = 5%; TPH suelo = 25%

Cálculo: $C \pm (U \times C/100)$ en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.



Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Página 1 de 1

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 2

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712393-S014

Rotulación Muestra:	ENSAYO 2 TRATAMIENTO 5 REP 2	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1712393-S014	
Parámetros Orgánicos en peso seco:		
Hidrocarburos Totales de petróleo (C8-C40) mg/kg ^(1,2)	59449 ^{o) n)}	EPA 8015 D / MM-S-23

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

o) Se realizó dilución 10X a la muestra, muestra con olor a hidrocarburo y cromatograma definido

INCERTIDUMBRE (U):

Humedad = 5%; TPH suelo = 25%

Cálculo: C +/- (UxC/100) en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.



Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Página 1 de 1

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 2

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712393-S015

Rotulación Muestra:	ENSAYO 2 TRATAMIENTO 5 REP 3	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1712393-S015	
Parámetros Orgánicos en peso seco:		
Hidrocarburos Totales de petróleo (C8-C40) mg/kg ^(1,2)	48949 ^{p) n)}	EPA 8015 D / MM-S-23

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

p) Muestra con olor a hidrocarburo y cromatograma definido

INCERTIDUMBRE (U):

Humedad = 5%; TPH suelo = 25%

Cálculo: C +/- (UxC/100) en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.



Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Análisis de HAP's final



REPORTE DE ANÁLISIS

Ciente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 2

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712393-S016

Rotulación Muestra:	ENSAYO 2 MUESTRA 2	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d ⁿ⁾	
No. Reporte Gruentec:	1712393-S016	
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco:		
Acenaftaleno mg/kg ^(1,2)	7.3	EPA 8270 D / MM-S-22
Acenafteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Antraceno mg/kg *	11	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(b)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(g,h,i)perileno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(k)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Criseno mg/kg ^(1,2)	1.8	EPA 8270 D / MM-S-22
Dibenzo(a,h)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fenantreno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoreno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Indeno(1,2,3 c,d) pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Naftaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

INCERTIDUMBRE (U):

HAP Suelo = 30%

Cálculo: C +/- (UxC/100) en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.

Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Página 1 de 1

Anexo 11. Mediciones de las variables

a. temperatura

fecha	T0			T1			T2			T3			T4			T5		
	R1	R2	R3															
28/08/2017	16,4	15,2	16,2	15,8	15,6	15,9	16,1	15,8	15,6	16,3	15,4	15,6	15,8	16,2	15,8	16,4	16,8	15,9
29/08/2017	15,8	15,3	15,2	15,1	15,1	15,3	15,2	15,2	15,1	15,2	15,2	15,4	15,1	15,6	15,7	16,1	15,9	15,9
30/08/2017	15,7	15,4	15,5	15,6	15,4	15,6	15,5	15,4	15,6	15,5	15,6	15,4	15,5	15,8	15,6	15,5	15,4	16,0
31/08/2017	17,6	16,1	16,2	16,3	16,2	16,1	15,9	15,9	16,2	16,1	16,1	16,0	15,9	16,2	16,0	15,8	15,9	16,3
01/09/2017	14,6	14,3	14,3	14,2	14,5	14,3	14,5	14,5	14,6	14,2	14,2	14,3	14,2	14,5	14,6	14,3	14,2	14,5
02/09/2017	15,8	15,6	15,7	15,7	15,6	15,6	15,6	15,6	15,4	15,6	15,5	15,7	15,6	15,6	15,7	16,0	15,9	15,5
03/09/2017	14,9	14,8	14,7	14,8	14,7	14,7	14,9	14,9	14,9	14,8	14,9	14,8	14,9	14,8	15,1	15,0	14,8	14,8
04/09/2017	15,3	15,1	15,1	15,0	15,2	15,3	15,3	15,3	15,0	15,2	15,3	15,2	15,2	15,8	15,4	15,9	16,0	15,7
05/09/2017	15,6	15,2	15,2	15,3	15,3	15,3	15,3	15,2	15,4	15,2	15,1	15,0	15,4	15,8	15,4	15,6	15,4	15,5
06/09/2017	16,5	16,2	16,3	16,1	16,2	16,0	16,3	16,2	16,0	16,1	16,2	16,1	16,2	16,5	16,6	16,2	16,8	16,5
07/09/2017	17,5	17,6	17,2	17,5	17,2	17,9	17,6	17,7	17,7	17,2	17,4	17,8	17,8	17,6	17,1	17,5	17,2	17,3
08/09/2017	14,6	14,5	14,5	14,6	14,2	14,2	14,3	14,2	14,5	14,8	14,3	14,9	14,7	14,5	14,6	14,8	14,7	14,6
09/09/2017	15,6	15,3	15,4	15,4	15,6	15,5	15,7	15,6	15,6	15,9	15,8	15,9	15,6	15,7	15,7	15,6	15,8	15,6
10/09/2017	14,7	14,9	14,9	14,9	14,8	14,9	14,8	14,9	14,8	15,1	14,9	14,8	15,1	15,0	15,0	15,1	14,8	14,9
11/09/2017	15,6	15,3	15,3	15,0	15,2	15,3	15,2	15,2	15,8	15,8	15,9	15,9	15,8	15,0	15,4	15,7	15,8	15,5
12/09/2017	16,7	16,9	16,2	16,3	17,0	15,9	16,5	16,9	17,1	15,8	16,5	16,2	16,3	16,8	16,1	16,2	16,1	16,4
13/09/2017	16,3	15,2	15,3	15,9	14,5	14,8	14,7	14,8	14,7	14,7	14,9	15,3	14,6	14,8	14,9	15,2	15,1	14,9
14/09/2017	14,9	15,0	14,9	14,8	14,7	14,8	14,7	14,7	14,9	15,1	15,3	15,5	15,3	15,4	15,4	15,5	15,6	14,8
15/09/2017	17,2	16,9	16,2	16,0	16,3	16,2	16,0	16,1	16,2	16,1	16,2	16,5	17,0	16,6	16,3	16,4	16,9	16,9
16/09/2017	15,6	16,0	15,8	15,6	15,4	15,6	15,6	15,5	15,4	15,4	15,6	15,9	16,1	15,5	15,4	15,6	15,9	16,2

17/09/2017	15,2	14,5	14,9	14,7	14,7	14,9	14,9	14,8	14,9	14,8	14,7	15,1	14,9	15,0	14,5	14,8	14,7	15,0
18/09/2017	14,8	15,6	15,7	15,7	15,6	15,6	15,6	15,6	15,4	15,6	15,5	15,4	15,9	15,8	15,7	15,5	15,3	15,9
19/09/2017	15,2	14,5	14,6	14,8	14,7	14,8	14,7	14,7	14,9	14,9	14,9	15,1	14,9	15,0	14,7	15,2	15,0	14,8
20/09/2017	15,9	15,0	15,2	15,5	15,3	15,4	15,9	15,7	15,2	15,9	15,9	16,0	16,2	15,8	15,7	15,9	15,7	15,6
21/09/2017	15,4	15,2	15,6	15,4	15,9	15,2	15,6	15,7	15,5	15,6	15,9	15,8	15,7	15,8	15,5	15,6	15,9	16,0
22/09/2017	14,8	14,9	15,8	15,4	15,8	14,9	14,1	16,1	16,8	14,9	15,8	14,5	15,1	14,8	16,6	15,4	14,6	15,4
23/09/2017	16,2	16,3	16,9	16,2	16,9	16,4	16,7	17,0	16,9	15,9	16,8	16,2	16,1	16,0	16,9	17,1	16,9	16,5
24/09/2017	16,5	16,2	16,3	16,0	16,8	16,4	16,5	16,8	16,9	16,2	16,4	16,8	16,4	16,9	16,7	16,8	16,7	16,5
25/09/2017	18,9	18,5	18,4	18,2	18,4	18,3	18,6	18,4	18,2	18,7	18,8	18,6	18,9	19,0	18,2	18,1	18,9	18,7
26/09/2017	17,5	17,0	17,0	17,5	17,4	17,9	17,5	17,4	17,8	17,2	17,3	17,0	17,5	17,8	17,0	17,7	17,9	18,2
27/09/2017	18,3	20,3	20,2	18,5	19,9	19,9	20,7	20,2	19,0	19,3	18,9	19,1	19,2	19,4	18,9	19,9	18,6	19,4
28/09/2017	16,4	16,2	16,4	16,2	16,9	16,3	16,7	17,3	17,0	16,5	17,6	16,9	17,3	16,8	17,4	16,5	16,3	17,1
29/09/2017	18,4	18,3	18,2	18,0	18,0	18,1	17,5	17,8	18,3	18,4	17,9	17,5	18,3	18,6	17,5	17,3	17,6	18,6
30/09/2017	16,5	16,4	16,1	17,2	17,6	17,2	16,4	16,9	17,2	17,0	16,9	16,4	17,3	16,9	16,7	17,1	17,0	16,9
01/10/2017	17,8	17,3	17,5	16,9	17,2	17,5	16,7	16,4	16,2	16,4	16,2	16,9	16,3	16,7	17,2	17,3	16,8	17,1
02/10/2017	16,7	17,3	17,0	16,5	17,6	16,9	17,3	16,8	17,4	17,0	17,4	16,8	16,9	16,7	16,8	17,2	17,5	16,5
03/10/2017	17,5	17,8	18,3	18,4	17,9	17,5	18,3	18,6	17,5	18,0	17,6	17,9	18,3	18,4	17,8	17,6	18,2	18,0
04/10/2017	16,5	17,6	16,9	17,3	17,8	17,9	17,8	16,4	17,3	16,8	16,5	16,6	17,3	17,9	16,8	16,7	16,9	17,0
05/10/2017	18,4	17,9	17,5	17,6	17,9	17,5	17,8	16,9	16,7	17,3	17,2	17,8	17,4	16,7	16,4	17,8	17,8	17,9
06/10/2017	16,5	16,0	16,8	16,9	16,2	17,2	17,1	16,8	17,5	16,4	15,7	15,2	16,9	16,7	17,0	17,1	16,4	15,9
07/10/2017	15,0	14,9	14,8	14,7	14,8	14,7	14,7	14,9	15,1	15,3	15,5	15,3	15,4	15,4	15,5	15,6	16,0	16,5
08/10/2017	16,9	16,2	16,0	16,3	16,2	16,0	16,1	16,2	16,1	16,2	16,5	17,0	16,6	16,3	16,4	16,9	15,8	15,9
09/10/2017	16,5	16,2	16,3	16,0	16,8	16,4	16,5	16,8	16,9	16,2	16,4	16,8	16,4	16,9	16,7	16,8	16,7	16,5
10/10/2017	18,9	18,5	18,4	18,2	18,4	18,3	18,6	18,4	18,2	18,7	18,8	18,6	18,9	19,0	18,2	18,1	18,9	18,7
11/10/2017	17,5	17,0	17,0	17,5	17,4	17,9	17,5	17,4	17,8	17,2	17,3	17,0	17,5	17,8	17,0	17,7	17,9	18,2
12/10/2017	16,2	16,4	16,9	15,9	16,8	16,2	14,5	15,7	15,8	15,8	15,6	18,1	14,9	15,1	17,6	15,1	15,6	15,1

13/10/2017	17,8	18,4	18,3	18,6	18,4	18,2	18,7	18,8	18,6	17,9	18,5	17,8	18,2	19,2	18,4	17,0	18,3	18,6
14/10/2017	17,9	18,2	18,4	18,2	18,4	18,3	18,6	18,4	18,2	18,7	18,8	18,6	18,9	19,0	18,2	18,1	18,9	19,9
15/10/2017	18,6	19,4	18,5	19,2	17,9	18,5	18,6	18,3	18,3	18,7	18,5	18,5	18,7	18,4	17,4	18,0	16,2	16,9
16/10/2017	16,3	17,1	18,0	18,0	18,1	17,5	17,8	18,3	18,4	17,9	17,5	18,3	18,6	18,0	18,2	18,5	18,0	18,0
17/10/2017	17,6	18,6	17,2	17,6	17,2	16,4	16,9	17,2	17,0	16,9	16,4	17,3	16,9	17,2	16,8	16,1	17,2	17,6
18/10/2017	17,0	16,9	16,9	17,2	17,5	16,7	16,4	16,2	16,4	16,2	16,9	16,3	16,7	16,8	17,1	17,5	16,9	17,2
19/10/2017	16,8	17,1	16,5	17,6	16,9	17,3	16,8	17,4	17,0	17,4	16,8	16,9	16,7	17,5	17,4	17,0	16,5	17,6
20/10/2017	17,5	16,5	17,9	17,5	17,6	17,9	17,5	17,8	16,9	16,7	17,3	16,9	17,5	18,1	18,0	17,5	17,6	17,9
21/10/2017	18,2	18,0	16,0	16,8	16,9	16,2	17,2	17,1	16,8	17,5	16,4	17,6	17,6	17,9	18,0	18,3	17,4	17,9
22/10/2017	16,2	16,3	16,0	16,8	16,4	16,5	16,8	16,9	16,2	16,4	16,8	16,4	16,9	16,7	16,8	16,7	16,5	16,8
23/10/2017	18,5	18,4	18,2	18,4	18,3	18,6	18,4	18,2	18,7	18,8	18,6	18,9	19,0	18,2	18,1	18,9	18,7	18,5
24/10/2017	17,0	17,0	17,5	17,4	17,9	17,5	17,4	17,8	17,2	17,3	17,0	17,5	17,8	17,0	17,7	17,9	18,2	17,4
25/10/2017	20,3	20,2	18,5	19,9	19,9	20,7	20,2	19,0	19,3	18,9	19,1	19,2	19,4	18,9	19,9	18,6	19,4	18,9

b. pH

fecha	T0			T1			T2			T3			T4			T5		
	R1	R2	R3															
28/08/2017	7,03	7,14	7,08	7,02	6,85	6,95	7,01	7,06	6,90	6,89	6,77	6,90	6,96	7,06	6,93	7,01	6,89	7,15
29/08/2017	6,85	7,22	6,94	6,90	7,22	6,79	6,80	6,91	7,01	7,06	6,90	6,91	6,90	6,90	7,01	7,06	6,90	7,20
30/08/2017	6,90	6,84	6,93	6,75	6,84	6,83	6,93	6,84	6,80	6,91	6,95	6,93	6,91	6,96	6,80	6,91	6,95	7,06
31/08/2017	7,01	7,06	6,90	6,90	6,90	6,90	7,14	6,66	6,66	6,84	7,05	7,06	6,98	7,06	6,82	6,99	7,02	7,09
01/09/2017	6,80	6,91	6,95	6,91	6,91	6,96	6,79	6,78	6,90	6,90	7,12	6,99	7,06	7,01	6,79	7,05	7,10	7,13
02/09/2017	6,92	6,98	6,99	6,98	6,98	7,06	6,83	6,85	6,91	6,96	7,06	7,01	7,09	7,08	6,81	7,10	7,09	7,06

03/09/2017	6,99	7,09	7,03	7,06	7,06	7,01	6,90	6,90	6,98	7,06	7,09	7,08	7,13	6,94	6,79	7,01	7,16	6,86
04/09/2017	7,01	6,80	6,84	6,83	7,09	7,08	6,96	7,01	7,06	7,01	7,13	6,94	7,06	6,93	6,83	7,14	7,22	6,79
05/09/2017	7,14	6,86	6,90	6,90	7,13	6,94	7,06	6,80	7,09	7,08	7,06	6,93	6,94	6,90	6,90	7,22	6,84	6,83
06/09/2017	7,22	6,79	6,91	6,96	7,06	6,93	7,01	6,92	7,13	6,94	7,01	6,84	6,83	6,91	6,96	6,84	6,90	6,90
07/09/2017	6,84	6,83	6,98	7,06	7,03	6,90	7,05	6,99	7,06	6,93	7,08	6,90	6,90	6,98	7,06	6,90	6,91	6,96
08/09/2017	6,90	6,90	7,06	7,01	6,96	6,95	6,96	7,01	7,15	7,02	6,94	6,91	6,96	7,06	7,01	6,91	6,98	7,06
09/09/2017	6,91	6,96	7,09	7,08	6,81	6,99	7,06	7,14	7,22	6,79	6,93	6,98	7,06	7,09	7,08	6,98	7,06	7,01
10/09/2017	6,98	7,06	7,13	6,94	7,00	7,03	7,01	7,22	6,84	6,83	6,90	7,06	7,01	7,13	6,94	6,89	7,09	7,08
11/09/2017	7,06	7,01	7,06	6,93	7,12	7,16	7,08	6,84	6,90	6,90	6,95	7,09	7,08	7,06	6,93	6,94	7,13	6,94
12/09/2017	7,09	7,08	7,03	6,90	7,20	7,25	6,94	6,45	6,91	6,96	6,99	7,13	6,94	7,03	6,90	6,91	7,06	6,93
13/09/2017	7,13	6,94	6,96	6,95	7,06	7,01	6,93	6,69	6,98	7,06	7,03	7,06	6,93	6,96	6,95	7,06	7,03	6,90
14/09/2017	7,06	6,93	6,89	7,13	7,09	7,08	6,80	6,78	7,06	7,01	7,06	7,03	6,90	6,81	6,99	7,12	6,96	6,95
15/09/2017	7,03	6,90	6,90	6,90	7,13	6,94	6,90	6,90	7,09	7,08	6,89	6,96	6,95	7,00	7,03	7,01	6,81	6,99
16/09/2017	6,96	6,95	6,91	6,96	7,06	6,93	6,91	6,96	7,13	6,94	6,96	7,30	7,20	6,93	7,09	7,08	7,00	7,03
17/09/2017	6,81	6,99	6,98	7,06	7,12	6,84	6,98	7,06	7,06	6,93	7,06	7,55	7,06	6,84	7,13	6,94	7,04	6,93
18/09/2017	7,00	7,03	7,06	7,01	6,85	6,83	7,06	7,01	7,03	6,90	7,01	7,24	7,09	6,79	7,06	6,93	7,03	6,90
19/09/2017	6,92	7,01	7,09	7,08	6,94	6,92	7,09	7,08	6,96	6,95	7,08	7,28	7,13	6,83	7,13	6,85	6,99	6,95
20/09/2017	6,89	6,94	7,13	6,94	6,89	7,03	7,13	6,94	6,81	6,99	6,94	7,39	7,06	6,90	7,15	6,83	6,91	6,99
21/09/2017	6,95	6,96	7,06	6,93	6,60	7,19	7,06	6,93	7,00	7,03	6,93	7,31	6,82	6,96	7,06	6,80	6,84	7,03
22/09/2017	7,02	6,91	6,98	7,19	6,92	7,30	7,17	6,91	6,93	6,92	6,81	7,39	6,79	7,06	6,93	6,79	6,83	7,18
23/09/2017	7,10	7,01	7,10	7,26	7,20	7,39	7,20	7,05	7,15	7,12	6,97	7,46	7,12	7,01	6,89	6,89	6,95	7,29
24/09/2017	6,98	7,10	7,16	7,29	7,35	7,46	7,29	7,19	7,26	7,28	7,20	7,50	7,28	7,43	7,09	7,14	7,06	7,24
25/09/2017	7,15	7,14	7,25	7,36	7,42	7,42	7,24	7,32	7,35	7,49	7,43	7,66	7,49	7,50	7,27	7,36	7,29	7,36
26/09/2017	7,25	7,20	7,42	7,45	7,55	7,53	7,32	7,49	7,50	7,64	7,49	7,72	7,64	7,45	7,45	7,42	7,36	7,49
27/09/2017	7,64	7,29	7,55	7,60	7,64	7,59	7,30	7,64	7,62	7,72	7,51	7,70	7,51	7,49	7,54	7,59	7,47	7,52
28/09/2017	7,36	7,42	7,51	7,60	6,99	7,28	7,15	7,38	7,43	7,49	6,96	7,62	7,45	7,51	7,39	7,32	7,55	7,38

29/09/2017	7,20	7,30	7,45	7,22	6,79	6,90	6,90	7,39	6,90	6,90	7,06	7,68	7,50	7,34	6,84	6,83	7,69	7,29
30/09/2017	7,25	7,26	7,50	6,84	6,83	6,91	6,96	7,45	6,91	6,96	7,01	7,69	7,62	7,31	6,90	6,90	7,55	7,17
01/10/2017	7,69	7,24	7,62	6,90	6,90	6,98	7,06	7,69	6,98	7,06	7,08	7,63	7,60	7,20	6,91	6,96	7,50	7,28
02/10/2017	7,55	7,30	7,60	6,91	6,96	7,06	7,01	7,55	7,06	7,01	6,94	7,64	7,59	7,34	6,98	7,06	7,45	7,43
03/10/2017	7,50	7,20	7,59	6,98	7,06	7,09	7,08	7,50	7,09	7,08	6,93	7,34	7,55	7,30	7,06	7,01	7,36	7,39
04/10/2017	7,19	7,30	7,55	7,06	7,01	7,13	6,94	7,19	7,13	6,94	7,26	7,28	7,50	7,20	7,09	7,08	7,34	7,55
05/10/2017	7,26	7,35	7,50	7,09	7,08	7,06	6,93	7,26	7,06	6,93	7,35	7,49	7,30	7,30	7,13	6,94	7,30	7,46
06/10/2017	7,30	7,39	7,30	7,13	6,94	7,36	7,10	7,30	7,08	7,49	7,50	7,64	7,26	7,35	7,06	6,93	7,26	7,28
07/10/2017	7,55	7,26	7,26	7,06	6,93	7,40	7,16	7,55	7,14	6,96	7,62	7,55	7,29	7,29	7,03	6,90	7,35	7,49
08/10/2017	7,24	7,20	7,29	7,03	6,90	7,46	7,18	7,24	7,36	7,06	7,68	7,69	7,32	7,38	6,96	6,95	7,50	7,64
09/10/2017	7,16	7,31	7,36	6,96	6,95	7,42	7,18	7,50	7,24	7,01	7,69	7,52	7,38	7,31	7,05	7,01	7,45	7,60
10/10/2017	7,05	7,35	7,25	6,81	6,99	7,53	7,29	7,43	7,55	7,08	7,42	7,46	7,40	7,50	7,19	6,94	7,29	7,43
11/10/2017	7,25	7,29	7,46	7,00	7,03	7,49	7,25	7,51	7,49	6,94	4,39	7,55	7,42	7,49	7,24	7,36	7,34	7,55
12/10/2017	7,45	7,25	7,57	7,68	7,55	7,41	7,38	7,62	7,43	6,93	7,30	7,61	7,36	7,59	7,36	7,42	7,25	7,53
13/10/2017	7,40	7,29	7,62	7,64	7,56	7,48	7,42	7,68	7,48	7,58	7,28	7,68	7,40	7,65	7,43	7,45	7,24	7,50
14/10/2017	7,36	7,31	7,69	7,66	7,62	7,46	7,40	7,69	7,42	7,55	7,32	7,69	7,45	7,69	7,49	7,55	7,29	7,56
15/10/2017	7,50	7,39	7,55	7,69	7,59	7,50	7,44	7,63	7,39	7,49	7,36	7,66	7,39	7,60	7,45	7,59	7,25	7,49
16/10/2017	7,62	7,32	7,53	7,62	7,60	7,46	7,50	7,64	7,41	7,52	7,33	7,59	7,45	7,57	7,35	7,62	7,31	7,45
17/10/2017	6,98	7,10	7,16	7,29	7,35	7,46	7,29	7,19	7,26	7,28	7,20	7,50	7,28	7,43	7,09	7,14	7,06	7,24
18/10/2017	7,15	7,14	7,25	7,36	7,42	7,42	7,24	7,32	7,35	7,49	7,43	7,66	7,49	7,50	7,27	7,36	7,29	7,36
19/10/2017	7,05	7,08	6,99	7,53	7,29	7,43	7,55	7,08	7,42	7,46	7,40	7,50	7,19	6,94	7,29	7,43	7,18	7,30
20/10/2017	6,81	6,99	6,98	7,06	7,12	6,84	6,98	7,06	7,06	6,93	7,06	7,55	7,06	6,84	7,13	6,94	7,04	6,93
21/10/2017	7,00	7,03	7,06	7,01	6,85	6,83	7,06	7,01	7,03	6,90	7,01	7,24	7,09	6,79	7,06	6,93	7,03	6,90
22/10/2017	6,92	7,01	7,09	7,08	6,94	6,92	7,09	7,08	6,96	6,95	7,08	7,28	7,13	6,83	7,13	6,85	6,99	6,95
23/10/2017	7,15	7,14	7,25	7,36	7,42	7,42	7,24	7,32	7,35	7,49	7,43	7,66	7,49	7,50	7,27	7,36	7,29	7,36
24/10/2017	7,25	7,20	7,42	7,45	7,55	7,53	7,32	7,49	7,50	7,64	7,49	7,72	7,64	7,45	7,45	7,42	7,36	7,49

25/10/2017	7,64	7,29	7,55	7,60	7,64	7,59	7,30	7,64	7,62	7,72	7,51	7,70	7,51	7,49	7,54	7,59	7,47	7,52
------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

c. humedad

semana	fecha	T0			T1			T2			T3			T4			T5		
		R1	R2	R3															
1	22/08/2017	49	61	61	61	61	61	61	61	61	60	60	62	61	60	61	61	62	62
2	28/08/2017	55	57	58	63	52	52	59	51	58	47	47	58	56	59	60	57	66	64
3	06/09/2017	59	55	51	48	61	53	61	49	51	59	55	53	58	55	51	57	59	60
4	13/09/2017	48	55	52	53	53	49	53	57	53	58	60	55	57	56	58	59	55	57
5	22/09/2017	53	50	50	50	50	50	50	50	53	50	51	50	50	50	50	49	53	50
6	27/09/2017	50	57	55	57	53	57	57	54	51	52	53	54	53	56	48	53	50	53
7	06/10/2017	56	55	58	54	59	57	60	59	55	54	56	53	51	52	57	59	58	56
8	12/10/2017	61	62	62	61	62	62	63	63	62	61	62	62	62	62	61	62	62	62
9	19/10/2017	59	58	60	58	59	58	60	60	59	59	60	60	60	58	57	59	58	60
10	25/10/2017	63	65	68	66	63	67	68	63	64	64	67	62	64	60	63	64	66	64

d. Conductividad eléctrica

uS																			
semana	fecha	T0			T1			T2			T3			T4			T5		
		R1	R2	R3															
1	22/08/2017	1160	1020	1200	1300	1250	1200	1230	1290	1250	1300	1100	1200	1150	1190	1170	1184	1160	1200
2	28/08/2017	700	750	700	840	760	750	800	730	780	750	720	860	810	792	750	850	810	765
3	06/09/2017	440	400	365	410	430	420	420	460	400	420	450	410	400	365	410	430	360	460
4	13/09/2017	175	200	230	250	195	246	253	261	290	300	275	280	280	250	190	210	186	150
5	22/09/2017	76	148	82	88	94	96	141	70	71	90	69	122	69	111	69	69	69	100
6	27/09/2017	30	30	29	27	29	28	27	30	31	28	30	27	30	28	14	27	19	28
7	06/10/2017	24	22	17	17	16	16	17	21	18	17	16	18	18	17	19	18	18	18
8	12/10/2017	9	12	10	14	15	14	10	10	13	16	15	13	14	15	14	9	15	15
9	19/10/2017	3	4	5	5	6	6	6	5	4	4	5	4	7	5	6	3	4	3
10	25/10/2017	0,2	0,5	0,5	0,4	0,2	0,7	0,8	0,9	1	0,3	0,5	0,8	0,6	0,7	0,8	0,6	0,8	0,7