



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES
CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

**“BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON
HIDROCARBUROS A TRAVÉS DE MICROORGANISMOS
NATIVOS A NIVEL DE LABORATORIO, PERIODO 2023”**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de Ingenieros
Ambientales

Autores:

Donoso Cáceres Dennis Steven

Valladolid Sánchez Jefferson Gabriel

Tutor:

Agreda Oña José Luis, Ing. Mg.

LATACUNGA – ECUADOR

Agosto 2023

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Donoso Cáceres Dennis Steven, con cédula de ciudadanía No. 1729125649 y Valladolid Sánchez Jefferson Gabriel, con cédula de ciudadanía No. 1724240708, declaramos ser autores del presente proyecto de investigación **“Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a través de microorganismos nativos a nivel de laboratorio, periodo 2023”**, siendo el Ingeniero Mg. José Luis Agreda Oña, Tutor del presente trabajo; y, eximimos expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certificamos que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de nuestra exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 14 de agosto del 2023



Dennis Steven Donoso Cáceres

Estudiante

CC: 1729125649



Jefferson Gabriel Valladolid Sánchez

Estudiante

CC: 1724240708



Ing. José Luis Agreda Oña, Mg.

Docente Tutor

CC: 0401332101

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **DONOSO CÁCERES DENNIS STEVEN**, identificado con cédula de ciudadanía **1729125649** de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. – EL CEDENTE es una persona natural estudiante de la carrera de Ingeniería Ambiental, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de **“BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS A TRAVÉS DE MICROORGANISMOS NATIVOS A NIVEL DE LABORATORIO, PERIODO 2023”**, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Octubre 2019- Marzo 2019

Finalización de la carrera: Abril 2023 - Agosto 2023

Aprobación en Consejo Directivo: 25 de Mayo del 2023

Tutor: Ing. José Luis Agreda Oña, Mg.

Tema: **“BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS A TRAVÉS DE MICROORGANISMOS NATIVOS A NIVEL DE LABORATORIO, PERIODO 2023”**

CLÁUSULA SEGUNDA. - LA CESIONARIA es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **EL CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 14 días del mes de agosto del 2023.



Dennis Steven Donoso Cáceres

EL CEDENTE

Dra. Idalia Pacheco Tigselema

LA CESIONARIA

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **VALLADOLID SANCHEZ JEFFERSON GABRIEL**, identificado con cédula de ciudadanía **1724240708** de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. – EL CEDENTE es una persona natural estudiante de la carrera de Ingeniería Ambiental, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de **“BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS A TRAVÉS DE MICROORGANISMOS NATIVOS A NIVEL DE LABORATORIO, PERIODO 2023”**, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Octubre 2019 - Marzo 2019

Finalización de la carrera: Abril 2023 - Agosto 2023

Aprobación en Consejo Directivo: 25 de Mayo del 2023

Tutor: Ing. José Luis Agreda Oña Mg.

Tema: **“BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS A TRAVÉS DE MICROORGANISMOS NATIVOS A NIVEL DE LABORATORIO, PERIODO 2023”**

CLÁUSULA SEGUNDA. - LA CESIONARIA es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **EL CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 14 días del mes de agosto del 2023.



Jefferson Gabriel Valladolid Sánchez

EL CEDENTE

Dra. Idalia Pacheco Tigselema

LA CESIONARIA

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutor del Proyecto de Investigación con el título:

“BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS A TRAVÉS DE MICROORGANISMOS NATIVOS A NIVEL DE LABORATORIO, PERIODO 2023” de Donoso Cáceres Dennis Steven Y Valladolid Sánchez Jefferson Gabriel, de la carrera de Ingeniería Ambiental, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también han incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 14 de agosto del 2023



Ing. José Luis Agreda Oña, Mg.

DOCENTE TUTOR

CC: 0502524481

AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, los postulantes: de Donoso Cáceres Dennis Steven y Valladolid Sánchez Jefferson Gabriel, con el título del Proyecto de Investigación: **“BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS A TRAVÉS DE MICROORGANISMOS NATIVOS A NIVEL DE LABORATORIO, PERIODO 2023”**, han considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

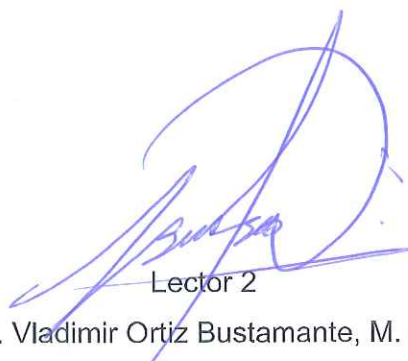
Latacunga, 14 de agosto del 2023



Lector 1 (Presidente)

Ing. Marco Antonio Rivera Moreno, Mg.

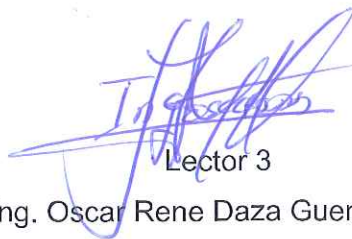
CC: 0501518955



Lector 2

Ing. Vladimir Ortiz Bustamante, M. Sc.

CC: 0502188451



Lector 3

Ing. Oscar Rene Daza Guerra, Mg.

CC: 0400689790

AGRADECIMIENTO

En la presente investigación en primer lugar, quiero expresar mi profundo agradecimiento a Dios por acompañarme en cada etapa de mi vida y por haberme brindado la posibilidad de alcanzar el logro que de niño anhelaba. También, quiero extender mi reconocimiento a la UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI, ya que, gracias a su generosa oportunidad de estudio, he podido forjar mi camino hacia la profesionalización. A mis padres, quienes con dedicación excepcional y un amor incondicional, me han brindado educación completa y han suplido cada una de mis necesidades. Sus valiosas enseñanzas, que pongo en práctica a diario, desempeñaron un papel fundamental en la realización exitosa de mi tesis. A mis hermanos Xavier, Daniela, David y Joel: por su apoyo, por estar presente en cada momento. Por darme sus positivos consejos, por su confianza, por ser los hermanos y amigos que son por eso y más. A los ingenieros; José Agreda, Verónica Andrade, Mishel Achig y Estefanía Ortega, cuya invaluable contribución, paciencia y persistencia fueron fundamentales para el éxito de este proyecto, además de contar con su apoyo me ha guiado y me ha brindado ideas que motivaron la investigación; gracias por su confianza.

Dennis Steven Donoso Cáceres

DEDICATORIA

Esta investigación se encuentra dedicada a Dios, ya que, gracias a su presencia constante, he logrado alcanzar numerosos de mis anhelos y metas. Con sincero afecto, dedico esta tesis a mi madre, Fátima Cáceres, pues sin ella no lo habría logrado. Tu constante guía a lo largo de mi vida me resguarda y me orienta hacia el sendero del bien. En muestra de gratitud por tu paciencia y amor, te ofrezco este trabajo como ofrenda. A aquellos amigos y colegas tanto del pasado como del presente, que generosamente compartieron su sabiduría, momentos felices y tristezas y a todas aquellas personas que durante estos cuatro años. Confío en contar siempre con su incondicional apoyo.

Dennis Steven Donoso Cáceres

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por concederme la salud necesaria para alcanzar este objetivo que tanto anhelaba.

A mi familia, por respaldarme y motivarme en mi camino hacia el crecimiento profesional, sus palabras de aliento y sus buenos deseos siempre han sido un motor para mí.

Expreso mi gratitud a la Universidad Técnica de Cotopaxi, por brindarme la oportunidad de crecimiento y formación profesional al abrirme sus puertas.

Mi agradecimiento también se dirige a mi Tutor, el Mg. José Luis Agreda, a las ingenieras, Verónica Andrade, Mishel Achig y Estefanía Ortega, cuyo apoyo, orientación y guía han sido fundamentales en el desarrollo exitoso de mi proyecto de investigación. Quiero reconocer a mis profesores, quienes a lo largo de mi trayectoria académica han contribuido de manera significativa a mi formación, aportando su valioso conocimiento y experiencia.

Jefferson Gabriel Valladolid Sánchez

DEDICATORIA

Padres, hermanos y enamorada, quiero expresar mi más profundo amor hacia cada uno de ustedes por ser mi apoyo constante durante esta etapa de mi vida. Su presencia incondicional e inmenso cariño han sido fundamentales para alcanzar este logro. A mis padres Wilber y Luisa, gracias por su sacrificio y entrega inquebrantable, su dedicación y amor incondicional han sido mi mayor motivación. Cada uno de sus consejos, palabras de aliento y apoyo financiero. Gracias por creer en mí y por ser mis pilares en los momentos más difíciles.

A mis hermanos Cristina y Dennis, que son mi mayor inspiración. Su alegría, entusiasmo y confianza en mis capacidades me han impulsado a esforzarme al máximo. Gracias por estar siempre a mi lado, por escucharme y brindarme su invaluable perspectiva. Cada uno de ustedes ha sido una pieza fundamental en mi crecimiento personal y académico. Y a ti, Noemí, has sido mi luz en los días oscuros y mi compañera constante en esta travesía. Tu amor incondicional, paciencia y comprensión han sido mi refugio en momentos de estrés y agotamiento. Gracias por motivarme a seguir adelante, por celebrar mis triunfos y por secar mis lágrimas en los momentos de fracaso. Eres mi mayor motivación y el motor que impulsa mi éxito.

Jefferson Gabriel Valladolid Sánchez

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS A TRAVÉS DE MICROORGANISMOS NATIVOS A NIVEL DE LABORATORIO, PERIODO 2023”

AUTORES:

Donoso Cáceres Dennis Steven

Valladolid Sánchez Jefferson Gabriel

RESUMEN

Esta investigación fue direccionada al análisis de microorganismos presentes en los suelos que han sufrido derrames petroleros cerca de las inmediaciones de las estaciones de producción de Petroecuador Ep, ubicado en la parroquia de Dayuma, provincia de Orellana en el campo petrolero Auca con el objetivo de evaluar la capacidad de remediación del suelo de dichos organismos unicelulares los cuales han sido expuestos a hidrocarburos por los accidentes operativos de la zona; el fin de este estudio fue verificar la presencia y rendimiento de la microbiota resistente la carburo fijándose en su desempeño de remediación con estímulos de atenuación natural como son; de métodos redox y adición de glucosa para comparar la potencialidad de los microorganismos en su remoción de contaminante en el suelo. Se llevó a cabo técnicas de aislamiento de microorganismos cultivables mediante el uso de medios de cultivo específicos después de realizar diluciones seriadas hasta 10^{-5} . Posteriormente, se clasificaron los grupos microbianos asociados a través de diferentes métodos como los morfológicos, tinción de Gram y pruebas bioquímicas, el propósito fue identificar el género bacteriano de los microorganismos. Además, se implementó un diseño de bloques al azar (DBA) con tres tratamientos T0 (Suelo + Hidrocarburo + agua), T1 (Suelo + hidrocarburo + agua + aireación) y T2 (suelo + hidrocarburo + agua + melaza). En el análisis estadístico de los resultados se empleó un ANOVA con una prueba Tukey al 5%. Obteniendo como resultados la presencia de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, siendo el género predominante *Serratia Sp* con un porcentaje del 39%. Otros géneros identificados incluyeron *Shigella Sp* con un 17%, *Hafnia Sp* con un 11%, *Yersina Sp* con un 11% *Enterocolitica Sp* con un 6%, *Citrobacter Sp*, *Freundi Sp* con un 6%, *Proteus Sp* con un 6%, *Klebsiella Sp* con un 6% y *Enterobacter Sp* con un 6%. Por último, se observó que dos de los tres tratamientos aplicados lograron degradar los hidrocarburos presentes en el suelo contaminado, siendo el tratamiento T3 el más efectivo con una tasa de degradación del 7484 mg/kg de los hidrocarburos totales (TPHs). Concluyendo que, si existen microgramos capaces de resistir los efectos de los hidrocarburos presentes en el suelo de la parroquia de Dayuma, además muestran que son capaces de degradar un 77% en suelos contaminados por hidrocarburos.

Palabras claves: diluciones, medios de cultivo, colonias bacterianas, TPHs, metabolismo.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI

FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND NATURAL RESOURCES

TITLE: "BIORREMEDICATION OF SOILS CONTAMINATED WITH HYDROCARBONS THROUGH NATIVE MICROORGANISMS AT THE LABORATORY LEVEL, PERIOD 2023"

AUTHORS:

Donoso Cáceres Dennis Steven

Valladolid Sánchez Jefferson Gabriel

ABSTRACT

This research was directed to the microorganisms analysis present in the soils, what have suffered oil spills near the production stations vicinity from Petroecuador Ep, located in the Dayuma parish, Orellana province in the Auca oil field with the aim by assessing the soils remediation capacity of said unicellular organisms, which have been exposed to hydrocarbons, due to operational accidents in the area; the purpose this study was to verify the carbide resistant microbiota presence and performance, looking at its remediation performance with natural attenuation stimuli, such as; redox methods and glucosa addition to compare the microorganisms potential their contaminants removal in the soil. It was carried out cultivable microorganisms isolation techniques, through specific culture media use after making serial dilutions up 10^{-5} . Subsequently, they were classified the associated microbial groups, through different methods, such as morphological, Gram staining and biochemical tests, the purpose was to identify the microorganisms bacterial genus. Further, it was implemented a randomized block design (DBA) with three treatments TO (Soil + Hydrocarbon + water), T1 (Soil + hydrocarbon + water + aeration) and T2 (soil + hydrocarbon + water + molasses). In the results statistical analysis, it was used an ANOVA with a 5% Tukey test. Getting as results, the bacteria presence belonging to the Enterobacteriaceae family, by being the predominant genus *Serratia* Sp with a 39% percentage. Other identified genera included *Shigella* Sp at 17%, *Hafnia* Sp at 11%, *Yersina* Sp at 11%, *Enterocolitica* Sp at 6%, *Citrobacter* Sp *Freundi* Sp at 6%, *Proteus* Sp at 6%, *Klebsiella* Sp with 6% and *Enterobacter* Sp with 6%. Finally, it was observed, which applied two from three treatments achieved to degrade the hydrocarbons present in the contaminated soil, with the T3 treatment being the most effective with a total hydrocarbons (TPHs) 7484 mg/kg degradation rate. Concluding that, if there are micrograms capable by resisting the hydrocarbons effects present in the soil from Dayuma parish, they also are capable by degrading 77% in soils contaminated by hydrocarbons.

Keywords: dilutions, culture media, bacterial colonies, TPHs, metabolism.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR	iii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR	vi
AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	ix
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	x
RESUMEN.....	xv
ÍNDICE DE TABLAS	xx
ÍNDICE DE FIGURAS	xxi
1 INFORMACIÓN GENERAL.....	1
2 JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	2
3 BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	3
4 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	4
5 OBJETIVOS	5
5.1 OBJETIVO GENERAL	5
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
6 ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.....	5
7 FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA.....	7
7.1 Antecedentes investigativos.....	7
7.2 Suelo	9
7.3 Suelo contaminado con hidrocarburos	9
7.4 Generalidades del petróleo	10
7.4.1 Origen y formación del petróleo	10
7.4.2 Petróleo crudo	10
7.4.3 Composición del petróleo.....	10
7.4.4 Impactos ambientales del petróleo.....	10
7.4.5 Impactos en el suelo causado por el petróleo	11
7.5 Hidrocarburos totales de petróleo (TPH).....	11
7.5.1 Efectos ambientales causados por los TPHs	12
7.6 Biorremediación de suelos.....	12
7.6.1 Tipos de Biorremediación	13
7.6.2 Ventajas y desventajas de la biorremediación	13
7.7 Complejo bacteriano.....	14
7.7.1 Bacterias presentes en el suelo:	14
7.8 Baterías bioquímicas	15
8 Marco legal.....	16
8.1 Constitución.....	16

9	HIPOTESIS INVESTIGATIVA	17
10	METODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	18
10.1	Tipo de investigación	18
10.2	Métodos.....	18
10.2.1	Revisión bibliográfica	18
10.2.2	Método cualitativo	18
10.2.3	Método cuantitativo.....	18
10.2.4	Instrumentos de investigación.....	18
10.2.5	Materiales y equipos	18
10.3	Objetivo 1: Cuantificar, aislar y caracterizar microorganismos nativos del suelo contaminado con hidrocarburos procedentes de la parroquia Dayuma, provincia de Orellana.....	19
10.3.1	Actividad 1: Recolección de tierra	19
10.3.2	Actividad 2. Diluciones seriadas	21
10.3.3	Actividad 3. Cuantificación	22
10.3.4	Actividad 4. Caracterización macroscópica.....	23
10.3.5	Actividad 5. Aislamiento axénico bacteriano.	23
10.3.6	Actividad 6. Caracterización microscópica (Tinción de Gram).....	23
10.3.7	Actividad 7. Determinación bioquímica de las bacterias.....	25
10.4	Objetivo 2: Realizar una crioconservación mediante congelamiento de las cepas recuperadas a partir del suelo contaminado con hidrocarburos, con el fin de conservarlas a largo plazo y permitir su utilización en estudios futuros para determinar su capacidad degradadora de hidrocarburos.	25
10.4.1	Actividad 1. Preparación los tubos de crioconservación con glicerol y el medio BHI. 25	
10.4.2	Actividad 2. Inoculación de bacterias	25
10.4.3	Actividad 3. Almacenamiento de los tubos preparados	25
11	Diseño experimental.....	26
11.1	Objetivo 3: Determinar el efecto de remoción de hidrocarburos en los suelos contaminados.....	26
11.1.1	Actividad 1. Preparación de muestras de suelo utilizando contenedores de plástico. 26	
11.1.2	Actividad 2. Desarrollo del experimento mediante la contaminación del suelo con hidrocarburos.	27
11.1.3	Actividad 3. Evaluación de la capacidad degradadora de las bacterias.....	28
12	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.	28
12.1	Diluciones seriadas.....	28
12.2	Caracterización macroscópica	29
12.3	Tinción Gram (microscópica)	34
12.4	Crioconservación de las bacterias aisladas	36

12.5	Baterías bioquímicas	36
12.6	Cantidad de Hidrocarburo presente el suelo (peso seco).....	37
12.7	Análisis de Varianza (ANOVA).....	37
12.8	Análisis de las variables de la muestra	38
12.8.1	pH de la muestra contaminada con hidrocarburo	38
12.8.2	Humedad de la muestra contaminada con hidrocarburo	39
12.8.3	Conductividad eléctrica de la muestra contaminada con hidrocarburo	39
12.8.4	Temperatura de la muestra contaminada con hidrocarburo	40
13	Discusión.....	40
14	IMPACTOS	43
14.1	Técnico:	43
14.2	Social:.....	43
14.3	Ambiental:.....	43
14.4	Económico:.....	43
15	CONCLUSIONES.....	44
16	RECOMENDACIONES	45
17	BIBLIOGRAFÍAS	46
18	ANEXOS	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Beneficiarios del Proyecto.....	3
Tabla 2 Matriz de actividades por objetivos	5
Tabla 3 Ventajas y desventajas de la biorremediación	13
Tabla 4 Identificación bioquímica de Enterobacterias	15
Tabla 5 Criterios de calidad del suelo	17
Tabla 6 Criterios de remediación (valores máximos permisibles).....	17
Tabla 7 Número mínimo de puntos de muestreo para el Muestreo de Identificación.	20
Tabla 8 Solución para la conservación de las bacterias aisladas.....	26
Tabla 9 Tratamientos aplicados en la unidad de experimentación durante la investigación.26	
Tabla 10 Conteo de las UFC de cada dilución (10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3}).....	28
Tabla 11 Cálculo de la dilución 10^{-3}	29
Tabla 12 Caracterización macroscópica del suelo ($M_4 10^{-3}$ y $M_2 10^{-3}$).....	30
Tabla 13 Caracterización microscópica de la ($M_4 10^{-3}$ y $M_2 10^{-3}$).....	34
Tabla 14 Características microscópicas de los Bacilos Gram negativos por el método de Tinción de Gram	35
Tabla 15 TPHs iniciales y finales.	37
Tabla 16 Análisis de ANOVA y Tukey al 5% del pH de la muestra.	38
Tabla 17 Análisis de ANOVA y Tukey al 5% de la humedad de la muestra.	39
Tabla 18 Análisis de ANOVA y Tukey al 5% de la conductividad eléctrica de la muestra. ..	39
Tabla 19 Análisis de ANOVA y Tukey al 5% de la temperatura de la muestra.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Georreferenciación del lugar de muestreo.....	20
Figura 2 Aspectos más comunes de la diversidad colonias microbianas aisladas.....	23
Figura 3 Morfología microscópica de las bacterias.....	24
Figura 4 Porcentaje de la forma que presentaron las colonias aisladas	31
Figura 5 Porcentaje del borde que presentaron las colonias aisladas	31
Figura 6 Porcentaje de la superficie que presentaron las colonias aisladas	32
Figura 7 Porcentaje de la elevación de las cepas bacterianas aisladas	33
Figura 8 Porcentaje de la pigmentación de las cepas bacterianas aisladas	33
Figura 9 Porcentaje de las características microscópicas de las colonias aisladas.	35
Figura 10 Porcentaje de bacterias identificadas	36
Figura 11 Analisis Tukey 5% de los tratamientos.	38

1 INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

“Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a través de microorganismos nativos a nivel de laboratorio, periodo 2023”

Lugar de ejecución:

Laboratorio de suelo de la Universidad Técnica de Cotopaxi, Cantón Latacunga, Provincia de Cotopaxi.

Institución, unidad académica y carrera que auspicia

Universidad Técnica de Cotopaxi, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, carrera de Ingeniería en Medio Ambiente.

Nombres de equipo de investigación:

Tutor: Ing. José Luis Ágreda Oña, Mg.

Estudiantes: Donoso Cáceres Dennis Steven y Valladolid Sánchez Jefferson Gabriel.

LECTOR 1: Mg. Marco Rivera

LECTOR 2: M. Sc. Vladimir Ortiz

LECTOR 3: Mg. Oscar Daza

Área de Conocimiento:

Ciencia Naturales. Medio Ambiente, Ciencias Ambientales.

Línea de investigación:

Protección ambiental

Sub-línea de Investigación de la Carrera:

Manejo y Conservación del Recurso Suelo

Línea de Vinculación de la Facultad: Impacto Ambiental

Gestión de recursos naturales, Biodiversidad, Biotecnología y Genética, para el desarrollo humano y social.

2 JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La presente investigación se centra en atender de manera urgente el grave problema de la contaminación del suelo en la Amazonia ecuatoriana, causada por la presencia de hidrocarburos. A pesar de ser una región de gran relevancia tanto en términos ecológicos como culturales, la actividad petrolera y otras acciones humanas han llevado a una alarmante acumulación de contaminantes. Para enfrentar esta situación, se propone la utilización de microorganismos en la biorremediación como una opción altamente viable y respetuosa con el entorno, con el objetivo de restaurar la salud del suelo y preservar la singularidad del ecosistema amazónico.

Este estudio no solo se adhiere a un enfoque teórico, sino que implica la creación de métodos específicos de biorremediación adaptados a las particulares condiciones de la Amazonia ecuatoriana. En este contexto, se busca identificar y aprovechar microorganismos nativos capaces de descomponer eficientemente los hidrocarburos presentes en el suelo contaminado. A través de este proceso, se persigue no solo remediar la contaminación, sino también generar conocimiento científico sobre los complejos procesos de biorremediación y la interacción entre microorganismos y contaminantes.

El impacto de este trabajo va más allá de la investigación, ya que contribuye significativamente a la conservación del medio ambiente y la rica biodiversidad de la Amazonia. Las comunidades locales, cuyo sustento depende directamente de la salud del suelo y los recursos naturales, se verían beneficiadas al contar con un enfoque integral para restaurar sus entornos esenciales. De igual manera, las autoridades gubernamentales y las organizaciones ambientales encuentran en este estudio un recurso valioso para abordar la contaminación y promover prácticas sostenibles que contribuyan a un futuro mejor para la región.

Las industrias y empresas involucradas en la explotación de recursos naturales también pueden obtener ventajas considerables de este estudio al encontrar soluciones efectivas para reducir y mitigar los impactos ambientales derivados de sus actividades. En última instancia, la mejora tangible en la calidad del suelo en la Amazonia tiene un efecto directo y positivo en la salud y equilibrio de diversos ecosistemas, así como en la preservación de la biodiversidad única de la región.

La reducción visible de la contaminación y la subsiguiente restauración de áreas degradadas se traducen en una disminución de posibles daños ambientales futuros, proporcionando una salvaguardia esencial para la sostenibilidad a largo plazo de la Amazonia. Al rehabilitar zonas previamente contaminadas, se allana el camino para su

recuperación y un uso continuo de manera sostenible, asegurando que las generaciones venideras puedan disfrutar de entornos restaurados y protegidos.

Este enfoque de biorremediación no solo beneficia al entorno, sino que también tiene un impacto directo en la salud humana y el bienestar, al reducir los riesgos asociados con la exposición a hidrocarburos en el suelo. En última instancia, esta investigación supera las fronteras de la Amazonia ecuatoriana al establecer un modelo innovador y sostenible para abordar la contaminación del suelo en regiones similares en todo el mundo, ofreciendo soluciones prácticas y concretas para uno de los desafíos más apremiantes en la gestión ambiental contemporánea.

3 BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Se detalla en la Tabla 1 los beneficiarios directos e indirectos, los cuales van a estar posiblemente involucrados con los beneficios de los resultados de la investigación.

Tabla 1

Beneficiarios del Proyecto

BENEFICIARIOS DIRETOS		BENEFICIARIOS INDIRECTOS	
Población del Cantón Orellana		Estudiantes de la Carrera de Ingeniería Ambiental	
Hombres:	34.272	Hombres:	201
Mujeres:	38.523	Mujeres:	321
Total:	72.795	Total:	522

Nota: En esta tabla se muestran los beneficiarios del proyecto

Elaborado por: Los autores, 2023.

4 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La contaminación del suelo con hidrocarburos plantea problemas ambientales significativos debido a la exhaustiva actividad de exploración y producción petrolera en el territorio (Sánchez Sánchez, 2020). Los incidentes de derrames, fugas y liberaciones accidentales de hidrocarburos pueden acarrear consecuencias adversas a largo plazo tanto para el medio ambiente como para la salud humana (Cárdenas Rodríguez, 2021).

La presencia de hidrocarburos en el suelo ocasiona su degradación, dado que estos compuestos exhiben toxicidad y persistencia en el medio ambiente. Por ejemplo, los incidentes de derrames de petróleo liberan sustancias como benceno, tolueno y xileno, los cuales son reconocidos como carcinógenos y compuestos orgánicos volátiles que contribuyen a la formación de smog (Chávez Atalaya, Aguilar García, Coloma Vásquez, Jara Zelaya, & Montoya Flores, 2021). Además, los hidrocarburos pueden infiltrarse en los acuíferos subterráneos, provocando la contaminación de los recursos hídricos subyacentes y afectando la disponibilidad de agua potable (Vilchez Marin, 2019).

En Ecuador, alrededor del 22% de la Amazonía se ha visto afectada por daños ambientales relacionados con el petróleo. Pulido & Argüello (2015) señalan que Chevron Texaco, una reconocida multinacional, fue la responsable de la mayor parte de estos daños en la región amazónica, donde operó desde 1964 hasta 1992, provocando severos impactos ambientales.

La exposición crónica a los hidrocarburos en el suelo puede afectar la diversidad biológica, ya que estos compuestos inhiben el crecimiento de plantas y microorganismos del suelo esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas. Asimismo, los hidrocarburos pueden acumularse en la cadena alimentaria, afectando negativamente a los organismos acuáticos y terrestres que dependen de ella (Almazán Castañeda, 2023).

Catagña (2016), menciona que durante la existencia del anterior consorcio Cepe-Texaco, se construyeron aproximadamente 549 piscinas, de las cuales 225 se incluyeron en el Plan de Acción de Restauración Ambiental. Sin embargo, solo se han restaurado 158 de estas piscinas. Por lo tanto, esta empresa multinacional es responsable de causar graves daños al medio ambiente, especialmente al suelo y agua en las regiones de Orellana y Sucumbíos.

Según Rodríguez (2018) Actualmente se han desarrollado varios métodos de biorremediación para restaurar la calidad de los suelos afectados por la contaminación por hidrocarburos. Antes de proceder con los procesos de tratamiento biológico, es necesario seleccionar la técnica adecuada, en función del tipo de contaminante presente y de las propiedades físicas y químicas del suelo.

En estudios piloto y de laboratorio, se ha demostrado que las bacterias nativas son altamente efectivas en la eliminación de hidrocarburos de petróleo. Además, se ha observado que las tasas de remoción pueden oscilar entre el 66% y el 93% (Martínez Prado, Pérez López, Pinto Espinoza, Gurrola Nevárez, & Osorio Rodríguez, 2011).

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de remediación del suelo que ha sido tratado previamente por contaminación con hidrocarburos, mediante la aplicación de tratamientos físicos y microbiológicos para determinar su efectividad.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar, aislar y caracterizar microorganismos nativos del suelo contaminado con hidrocarburos procedentes de la parroquia Dayuma, provincia de Orellana.
- Realizar una crioconservación mediante congelamiento de las cepas recuperadas a partir del suelo contaminado con hidrocarburos, con el fin de conservarlas a largo plazo y permitir su utilización en estudios futuros para determinar su capacidad degradadora de hidrocarburos.
- Determinar el efecto de remoción de hidrocarburos para remediación en los suelos contaminados.

6 ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

En la tabla 3 se detallan las actividades y resultados esperados de acuerdo a los objetivos planteados.

Tabla 2

Matriz de actividades por objetivos

Objetivos	Actividad	Metodología	Resultados
<p>OE1. Cuantificar, aislar y caracterizar microorganismos nativos del suelo contaminado con hidrocarburos procedentes de la provincia de Orellana, parroquia Dayuma.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Recolección de tierra • Diluciones seriadas • Cuantificación • Caracterización macroscópica • Aislamiento • Caracterización microscópica • Determinación bioquímica de las bacterias. 	<ul style="list-style-type: none"> • Método sistemático • Técnica de diluciones seriadas • Método de cuantificación de microorganismos • Cálculo de UFC • Revisión bibliográfica • Revisión bibliográfica • Tinción de Gram • Baterías bioquímicas 	<p>Bacterias nativas aisladas de la muestra contaminada con hidrocarburos.</p>
<p>OE2. Realizar una crioconservación mediante congelamiento de las cepas recuperadas a partir del suelo contaminado con hidrocarburos, con el fin de conservarlas a largo plazo y permitir su utilización en estudios futuros para determinar su capacidad degradadora de hidrocarburos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Preparación los tubos de crioconservación con glicerol y el medio BHI. • Inoculación de bacterias • Almacenamiento de los tubos preparados. 	<ul style="list-style-type: none"> • Selección y preparación del material • Siembra • Congelación y registro. 	<p>54 muestras de bacterias aisladas enviadas a crioconservación.</p>

<p>OE3. Determinar el efecto de remoción de hidrocarburos en los suelos contaminados.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Preparación de muestras de suelo utilizando contenedores de plástico. • Desarrollo del experimento mediante la contaminación del suelo con hidrocarburos. • Evaluación de la capacidad degradadora de las bacterias. 	<ul style="list-style-type: none"> • Diseño de bloques al azar. • Metodología establecida por Pérez, 2018. • Análisis TPH 	<p>Diagnóstico de la capacidad degradadora de hidrocarburos.</p>
--	--	--	--

Nota: Esta tabla proporciona una descripción detallada de las actividades y los resultados esperados con respecto a los objetivos establecidos.

Elaborado por: Los autores, 2023.

7 FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

7.1 Antecedentes investigativos

Cuando se llevan a cabo perforaciones, extracciones y la comercialización de petróleo, se generan una serie de residuos que han sido descargados en el terreno a lo largo de décadas debido a una deficiente gestión y falta de conciencia medioambiental (Amador Cervantes, 2021). Como consecuencia, la contaminación del suelo por hidrocarburos puede tener graves consecuencias en el medio ambiente y la salud humana. Es importante tomar medidas para evitar la contaminación y, en caso de que ocurra, remediar la situación de manera adecuada para minimizar los impactos negativos en el medio ambiente y la salud de las personas (Cruz Perez, Cruz Mendez, & Cruz Mendez, 2020). En Ecuador, la biorremediación es una técnica utilizada para la descontaminación de suelos y cuerpos de agua afectados por la actividad petrolera y otros contaminantes. La técnica ha sido empleada en diversas regiones del país donde se han registrado impactos ambientales negativos, ya que, esta técnica es utilizada para reducir los niveles de metales pesados y otros contaminantes en el suelo y el agua (Niño Zárate, 2023).

La biorremediación puede ser una alternativa más económica y sostenible a los métodos de limpieza tradicionales, como la excavación y el transporte de contaminantes a un vertedero (Berrios Moron, 2022). Según Santos (2016), el objetivo de la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos es "utilizar microorganismos para degradar los compuestos orgánicos presentes en el suelo y reducir la concentración de contaminantes"

Para que la biorremediación se utilice como método alternativo de tratamiento de suelos, se deben considerar los siguientes criterios: a) los organismos deben tener la actividad metabólica necesaria para descomponer los contaminantes a una tasa aceptable para cumplir con las pautas. b) Las condiciones deben ser favorables para la actividad microbiana y el proceso debe ser más económico o, en el peor de los casos, no más costoso que otras tecnologías de eliminación de la contaminación (García, 2021).

Según González (2020), la contaminación de suelos con hidrocarburos es un problema ambiental significativo debido a que los hidrocarburos son sustancias químicas tóxicas y persistentes que pueden permanecer en el suelo durante años y dañar el ecosistema. Los hidrocarburos pueden matar la vida microbiana en el suelo, que es importante para la fertilidad del suelo y la eliminación de contaminantes. También pueden ser absorbidos por las plantas y animales que viven en el suelo, lo que puede provocar efectos adversos en la salud humana y la cadena alimentaria. Además, los hidrocarburos pueden contaminar las fuentes de agua subterránea, que a su vez pueden afectar la calidad del agua potable (Ritorè, 2021). Por lo tanto, es importante tomar medidas para prevenir y remediar la contaminación del suelo con hidrocarburos, incluyendo la aplicación de técnicas de biorremediación y otros métodos de limpieza efectivos.

Es cierto, las tecnologías de remediación pueden clasificarse de diferentes maneras, dependiendo de los criterios utilizados para su categorización (Ito Chalco, 2022). Algunas formas comunes de clasificar las tecnologías de remediación son las siguientes:

- **Según el tipo de contaminante:** En este caso, las tecnologías se clasifican según el tipo de contaminante que se quiere eliminar, por ejemplo, hidrocarburos, metales pesados, contaminantes orgánicos persistentes, entre otros.
- **Según el enfoque de la técnica:** En este caso, las tecnologías se clasifican según el enfoque principal de la técnica, por ejemplo, físicas, químicas o biológicas.
- **Según el proceso de remediación:** En este caso, las tecnologías se clasifican según el proceso principal de remediación, por ejemplo, extracción, adsorción, oxidación, biorremediación, entre otros.
- **Según la escala de implementación:** En este caso, las tecnologías se clasifican según la escala de implementación, que puede variar desde un sitio específico hasta una escala regional o nacional.
- **Según la complejidad y costo:** En este caso, las tecnologías se clasifican según su complejidad técnica y su costo de implementación, desde tecnologías simples y económicas hasta tecnologías complejas y costosas.

La biorremediación con microorganismos nativos del suelo se puede aplicar a una variedad de contaminantes del suelo, incluyendo hidrocarburos, plaguicidas, metales pesados, entre otros (Novoa García, Microorganismos como herramienta para minimizar el impacto ambiental por derrame de hidrocarburos. [Tesis de Pregrado, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales], 2022). Esta técnica puede ser más efectiva en suelos contaminados de manera natural, ya que los microorganismos nativos pueden estar más adaptados a la contaminación específica presente en el suelo (Sierra Gómez, 2021).

7.2 Suelo

El suelo es una capa superficial de la Tierra que provee soporte físico y nutrientes para el crecimiento de las plantas. Está compuesto por una mezcla de minerales, materia orgánica, agua, aire y organismos vivos (Almazán Castañeda, 2023). El suelo se forma a través de un proceso de meteorización y descomposición de las rocas madre, influenciado por factores climáticos, geológicos y biológicos.

7.3 Suelo contaminado con hidrocarburos

El suelo contaminado con hidrocarburos se refiere a la presencia no deseada y en concentraciones significativas de compuestos orgánicos de hidrógeno y carbono (hidrocarburos) en el suelo, generalmente como resultado de actividades humanas, como derrames de petróleo, fugas de combustibles o desechos industriales (Argandoña Díaz & Siguenza Carlos, 2020). Estos hidrocarburos pueden ser en forma de petróleo crudo, gasolina, diesel u otros productos derivados del petróleo.

La contaminación del suelo con hidrocarburos puede tener efectos negativos en el medio ambiente y la salud humana. Los hidrocarburos son sustancias químicas que pueden ser tóxicas para los organismos vivos, alterar las propiedades físicas y químicas del suelo, y afectar la calidad del agua subterránea y la biodiversidad (Lopez Dinorin, 2020). La presencia de hidrocarburos en el suelo puede alterar la estructura del suelo, reduciendo su capacidad para retener agua y nutrientes, lo que afecta negativamente el crecimiento de las plantas. Además, los hidrocarburos pueden migrar a través del suelo y alcanzar las capas freáticas, contaminando así las fuentes de agua subterránea utilizadas para el consumo humano y agrícola (González, 2020).

7.4 Generalidades del petróleo

7.4.1 Origen y formación del petróleo

El origen del petróleo se encuentra en la descomposición de materia orgánica, la cual es generada por microorganismos. Este proceso es impulsado principalmente por el aumento de las temperaturas y el enterramiento de materia orgánica durante millones de años (Sencia Choquenaira, 2020).

7.4.2 Petróleo crudo

De acuerdo con Serrano (2020), el petróleo es una sustancia líquida de alta viscosidad, caracterizada por su variabilidad cromática que puede presentarse en tonalidades que abarcan desde el verde hasta el negro, pasando por el amarillo y el marrón. Esta sustancia se compone de manera compleja de hidrocarburos, los cuales son compuestos químicos formados por átomos de carbono e hidrógeno en diversas proporciones (Acevedo Rojas, 2023).

7.4.3 Composición del petróleo

El petróleo crudo se compone principalmente de carbono e hidrógeno, contiene varias impurezas diferentes como azufre, nitrógeno, oxígeno, asfaltenos, metales (como Ni, V, Fe, Cu, Mg, Ca y Na) y sales (Velasco Cruz, 2019). Es importante destacar que la concentración de estas impurezas no depende de si el petróleo es ligero o pesado, sino que varía independientemente del lugar de donde se extrae (Torres Mateu, 2023).

Tabla 3

Intervalo de composición del petróleo crudo a nivel mundial

Composición	Intervalo de concentración, % peso
Carbón	83.0-87.0
Hidrógeno	10.0-14.0
Nitrógeno	0.1-2.0
Oxígeno	0.05-1.5
Azufre	0.04-6.0
Metales (Ni + V)	< 1000 ppm
Asfaltenos	0.1 – 12
Residuo de carbón	0.2 – 10

Fuente: (Marroquin Sanchez, 2007)

7.4.4 Impactos ambientales del petróleo

Según Mayorga (2017), menciona que la descarga de hidrocarburos en el entorno circundante ya sea intencional, accidental o debido a prácticas laborales inadecuadas,

constituye un derrame de petróleo. Estos derrames son una de las principales fuentes de contaminación humana, pudiendo propagarse rápidamente dependiendo de la naturaleza de los hidrocarburos y las condiciones climáticas y topográficas de la zona (Villanueva Vergara, 2020).

Los efectos resultantes de un derrame pueden ser duraderos, poniendo en riesgo tanto la vida humana como la de especies dentro de su área de influencia, y causando daños a largo plazo al ecosistema (Antúnez Sánchez & Bruzón Viltres, 2012).

Los derrames de petróleo pueden tener un impacto severo en el funcionamiento normal del entorno, poniendo en peligro las zonas de vida, como hábitats, áreas protegidas y ecosistemas delicados, así como las especies autóctonas o endémicas que tienen importancia ecológica, económica y cultural para el país (Prado Loza, 2021).

7.4.5 Impactos en el suelo causado por el petróleo

La contaminación del suelo causada por el petróleo tiene efectos devastadores en el entorno natural. Cuando se produce un derrame de petróleo, ya sea en tierra o en cuerpos de agua cercanos, el petróleo crudo y sus productos derivados pueden infiltrarse en el suelo y afectar gravemente su composición y capacidad para sustentar la vida vegetal y animal (Oquendo Contreras & Arcila Arcila, 2022).

El petróleo crudo es una mezcla compleja de hidrocarburos que contiene compuestos tóxicos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y los compuestos volátiles orgánicos (VOC) (Pinzón Rodríguez, 2022). Estos productos químicos son altamente contaminantes y persistentes en el suelo, lo que significa que pueden permanecer durante mucho tiempo después del derrame inicial.

Cuando el petróleo contamina el suelo, interfiere con los procesos biológicos y químicos que son esenciales para la salud y fertilidad del suelo. El petróleo cubre los poros y espacios entre las partículas del suelo, impidiendo el intercambio de gases y la circulación de agua (Lopez Dinorin, 2020). Esto puede provocar la asfixia de microorganismos beneficiosos, como bacterias y hongos, que desempeñan un papel crucial en la descomposición de la materia orgánica y la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Mejía Guerra, 2022).

7.5 Hidrocarburos totales de petróleo (TPH)

Los compuestos conocidos como TPH, abreviatura de Hidrocarburos Totales de Petróleo, son una combinación de productos químicos compuestos principalmente de hidrógeno y carbono. Como expresa (Tamba Pineda, 2023), los TPH se dividen en grupos de hidrocarburos de petróleo según su comportamiento en el suelo o agua, denominados como

fracciones de hidrocarburos de petróleo. Cada fracción se compone de diversos productos químicos individuales.

7.5.1 Efectos ambientales causados por los TPHs

Cuando los TPHs son liberados al medio ambiente, ya sea a través de derrames de petróleo, fugas en tanques de almacenamiento u otras actividades humanas, pueden tener efectos ambientales significativos (Villa Morales, 2019). Estos compuestos son persistentes y pueden contaminar el suelo, el agua y el aire. En el suelo pueden afectar la estructura y la función del ecosistema, inhibiendo la actividad de microorganismos beneficiosos y reduciendo la fertilidad del suelo (Ureño García, 2023). En los cuerpos de agua pueden causar daños a los organismos acuáticos, alterando los ciclos biogeoquímicos y afectando la calidad del agua. En el aire pueden contribuir a la contaminación atmosférica y la formación de smog (Gutiérrez García, 2022). Además, algunos TPHs son tóxicos y carcinogénicos, lo que representa un riesgo para la salud humana y la vida silvestre. Por lo tanto, es esencial implementar medidas de prevención, control y remediación para reducir la liberación de TPHs y mitigar sus impactos en el medio ambiente (Villa Morales, 2019).

7.5.1.1 Efecto sobre el suelo

Cuando ocurren derrames de petróleo u otros productos derivados de hidrocarburos, se produce una contaminación del suelo que puede afectar gravemente la vida vegetal y animal. Los hidrocarburos pueden alterar las propiedades físicas y químicas del suelo, como su estructura, textura y capacidad de retención de agua (Sossa López, 2019). Esto puede dificultar el crecimiento de las plantas y la supervivencia de los organismos del suelo. Además, los hidrocarburos pueden ser tóxicos para muchas formas de vida, afectando la biodiversidad y los ecosistemas. También pueden contaminar las fuentes de agua subterránea, lo que tiene un impacto negativo en la calidad del agua y la salud humana (Portilla Farfán, León Avecillas, & Ulloa Bermeo, 2022).

7.6 Biorremediación de suelos

Según Pérez (2018) la biorremediación es una estrategia que emplea microorganismos nativos o introducidos, como plantas, hongos, algas y bacterias de pequeño tamaño, para limpiar entornos específicos que contienen materiales peligrosos. Estos organismos tienen habilidades metabólicas que les permiten neutralizar sustancias tóxicas presentes en el entorno contaminado, convirtiéndolas en formas menos perjudiciales y eliminándolas de manera más efectiva (Ibáñez Espín, 2022). Esta técnica promueve las condiciones aeróbicas necesarias para la biorremediación, un proceso natural que ocurre de forma inherente en el suelo.

7.6.1 Tipos de Biorremediación

- Fitorremediación: Se basa en el uso de algas para eliminar contaminantes. Las algas tienen la capacidad de absorber y acumular sustancias tóxicas, ayudando a limpiar el ambiente contaminado.
- Micorremediación: Esta técnica emplea hongos que poseen la capacidad de degradar sustancias tóxicas. Estos hongos liberan enzimas que descomponen los contaminantes, permitiendo su eliminación o transformación en compuestos menos dañinos.
- Fitorremediación: Consiste en utilizar plantas para absorber y remover materiales tóxicos presentes en suelos o aguas contaminadas. Las plantas actúan como filtros naturales, capturando los contaminantes y reduciendo así la contaminación del entorno
- Degradación enzimática: Esta técnica se basa en el uso de enzimas producidas por organismos específicos para degradar sustancias contaminantes. Estas enzimas aceleran la descomposición de los contaminantes en compuestos más simples y menos perjudiciales (Guerra Yepes, 2019).

7.6.2 Ventajas y desventajas de la biorremediación

Tabla 3

Ventajas y desventajas de la biorremediación

Ventajas	Desventajas
Utiliza microorganismos naturales para degradar los contaminantes, lo que la convierte en una opción respetuosa con el medio ambiente.	Puede ser un proceso lento y requerir un tiempo prolongado para completarse.
Puede ser efectiva para tratar una amplia variedad de contaminantes, incluyendo hidrocarburos, compuestos orgánicos persistentes y metales pesados.	Algunos contaminantes pueden ser más difíciles de degradar mediante biorremediación.
En comparación con otras tecnologías de remediación, la biorremediación puede ser más económica.	Requiere una supervisión y monitoreo continuos para asegurar que los microorganismos estén funcionando correctamente y que los niveles de contaminantes se reduzcan de manera adecuada.

Puede llevarse a cabo directamente en el lugar contaminado (in situ).

Elaborado por: Los autores, 2023.

7.7 Complejo bacteriano

Un complejo bacteriano es una comunidad diversa de bacterias que viven juntas, interactúan y comparten funciones en un ambiente específico, como el suelo, el agua o el tracto gastrointestinal. Estas interacciones pueden incluir competencia, cooperación y simbiosis, y estas comunidades tienen un impacto crucial en la salud y el funcionamiento de los sistemas biológicos, como en la digestión y protección contra enfermedades en el intestino humano.

7.7.1 Bacterias presentes en el suelo:

- **Serratia:** La *Serratia* es un género de bacterias conocido por su capacidad para degradar compuestos de petróleo y otros hidrocarburos. Estas bacterias son consideradas microorganismos degradadores de petróleo debido a su habilidad para descomponer y metabolizar diferentes componentes del petróleo, como los hidrocarburos aromáticos y alifáticos.

- **Hafnia:** Es un género de bacterias que ha demostrado tener la capacidad de degradar hidrocarburos, incluido el petróleo. Estas bacterias pueden descomponer los compuestos del petróleo en componentes más simples a través de procesos metabólicos, lo que ayuda en la eliminación y descomposición de la contaminación por petróleo en el medio ambiente.

- **Yersenia:** Tienen la capacidad de descomponer o degradar compuestos derivados del petróleo, como los hidrocarburos. Estas bacterias son conocidas por su capacidad para utilizar el petróleo como fuente de carbono y energía, lo que les permite sobrevivir y crecer en ambientes contaminados con petróleo crudo o productos derivados del petróleo.

- **Citrobacter:** Es un género de bacterias que incluye diversas especies capaces de degradar compuestos del petróleo. Estas bacterias tienen la capacidad de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono y energía, lo que significa que pueden descomponer y metabolizar componentes del petróleo crudo.

- **Proteus:** Estas bacterias desempeñan un papel importante en la biodegradación de hidrocarburos presentes en derrames de petróleo o en entornos contaminados por productos petroleros. Utilizan enzimas y procesos metabólicos especializados para descomponer los componentes del petróleo en sustancias más simples y menos dañinas para el medio ambiente.

- **Klebsiella:** Estas bacterias son conocidas por su capacidad para utilizar los componentes del petróleo como fuente de energía y nutrientes a través de procesos de degradación biológica.
- **Enterobacter:** Estas bacterias poseen enzimas y vías metabólicas que les permiten descomponer los compuestos del petróleo en componentes más simples, lo que ayuda a reducir la contaminación ambiental causada por derrames de petróleo y vertidos (Sierra Gómez, 2021).

7.8 Baterías bioquímicas

La identificación bioquímica de bacterias implica el uso de una variedad de pruebas para evaluar las características metabólicas y bioquímicas de las bacterias (Mendoza Lombana, 2022). En la identificación bioquímica de bacterias, se utilizan pruebas que abarcan la fermentación de distintos carbohidratos, la síntesis de enzimas como la catalasa y la ureasa, la habilidad de producir indol, el aprovechamiento de citrato como fuente de carbono, así como pruebas específicas como la coagulasa para diferenciar especies particulares (Ripe Jaime, 2019). Además, las pruebas de sensibilidad a los antibióticos también son importantes para determinar la respuesta de las bacterias a los tratamientos farmacológicos. La combinación de estas pruebas proporciona información clave para la identificación precisa de las bacterias y su clasificación taxonómica, como se muestra en la tabla 5.

Tabla 4

Identificación bioquímica de Enterobacterias

Identificación bioquímica de Enterobacterias	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
Indol	+	-/+	-	-	+	+	-	+	-
Citrato de Simmons	-	-	+	+	+	-	+	+	+
H ₂ S(TSI)	-	-	+	+	-	+/-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-/+	+/-	-	+/-	+/-	-
Movilidad	+/-	-	+	+	+	+	-	-	+
Lisina	+	-	+	-	-	+	+/-	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas de glucosa	+	-	+	-/+	+	+/-	+	+	+

Lactosa	+/-	-	-	+/-	+/-	-	+	+	+
Sacarosa	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+

Fuente: Koneman, 2006

8 Marco legal

8.1 Constitución

Este proyecto de investigación se sostiene bajo a la Constitución de la república del Ecuador, la Ley de gestión y uso del suelo y el Acuerdo Ministerial 097 A el cual propone:

“...Que, el numeral 27 del artículo 66 de la Constitución de la República del Ecuador, determina el derecho a vivir en un ambiente sano, ecológicamente equilibrado, libre de contaminación y en armonía con la naturaleza...”

Es crucial asegurar la preservación de la naturaleza y la protección de sus derechos, tal como se expone en este artículo.

“...Que, el artículo 276, número 4, de la Constitución de la República del Ecuador, establece que uno de los objetivos del régimen de desarrollo será recuperar y conservar la naturaleza y mantener un ambiente sano y sustentable que garantice a las personas y colectividades el acceso equitativo, permanente y de calidad al agua, aire y suelo, y a los beneficios de los recursos del subsuelo y del patrimonio natural...”

Este enfoque busca garantizar a las personas y comunidades un acceso equitativo y de alta calidad a los recursos esenciales, como el agua, el aire, el suelo.

Según el (Ministerial, A. 097, 2015)

Criterios de calidad del suelo. -

Literal 4.4.2 *“...Los criterios de calidad del suelo son valores de fondo aproximados o límites analíticos de detección para un contaminante presente en el suelo. Los valores de fondo se refieren a los niveles ambientales representativos para un contaminante en el suelo. Estos valores pueden ser el resultado de la evolución natural del área, a partir de sus características geológicas, sin influencia de actividades antropogénicas. Los criterios de calidad del suelo constan en la Tabla...”*

Criterios de remediación del suelo

Literal 4.4.4. *“...Los criterios de remediación se establecen de acuerdo al uso del suelo, tienen el propósito de establecer los niveles máximos de concentración de contaminantes en un suelo luego de un proceso de remediación, y son presentados en la Tabla 2...”*

Tabla 5*Criterios de calidad del suelo*

Parámetro	Unidades	* Valor
Parámetros Generales		
Conductividad		200
pH	uS/cm	6 a 8
Relación de adsorción de Sodio (Índice SAR)		4*

Fuente: Acuerdo ministerial 097A, 2015**Tabla 6***Criterios de remediación (valores máximos permisibles)*

Parámetro	Expresado en	Unidad	Uso agrícola	Uso industrial	Ecosistemas sensibles
Hidrocarburos totales	<i>TPH</i>	<i>mg/kg</i>	<2500	<4000	<1000
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)	<i>C</i>	<i>mg/kg</i>	<2	<5	<1
<i>Cadmio</i>	<i>Cd</i>	<i>mg/kg</i>	<2	<10	<1
<i>Niquel</i>	<i>Ni</i>	<i>mg/kg</i>	<50	<100	<40
<i>Plomo</i>	<i>Pb</i>	<i>mg/kg</i>	<100	<500	<80

Fuente: Acuerdo ministerial 097A, 2015

9 HIPOTESIS INVESTIGATIVA

En base a los antecedentes y los problemas que se quiere resolver se ha planteado dos hipótesis:

HA: ¿Existen microorganismos capaces de resistir los efectos de los hidrocarburos presentes en los suelos de la Amazonia ecuatoriana que muestren un mayor potencial para degradar TPHs en suelos contaminados con hidrocarburos?

H0: ¿No existen microorganismos capaces de resistir los efectos de los hidrocarburos presentes en los suelos de la Amazonia ecuatoriana que muestren un mayor potencial para degradar TPHs en suelos contaminados con hidrocarburos?

10 METODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

10.1 Tipo de investigación

En esta investigación se adopta un estudio experimental que combina un enfoque mixto, utilizando observación directa y análisis de fuentes bibliográficas.

10.2 Métodos

10.2.1 Revisión bibliográfica

Se utilizó principalmente el enfoque de revisión de fuentes bibliográficas en esta investigación, ya que en el contexto de Ecuador hay una carencia de investigaciones relaciones a la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Por lo tanto, la revisión bibliográfica cobra relevancia al permitirnos recopilar información valiosa y pertinente.

10.2.2 Método cualitativo

Se optó por emplear un enfoque metodológico cualitativo. Esto implica que se investigarán y analizarán las bacterias desde una perspectiva cualitativa, centrándose en las características.

10.2.3 Método cuantitativo

Se aplicó un enfoque de metodología cuantitativa. Esta aproximación involucra el uso de herramientas numéricas y estadísticas para evaluar y comprender las concentraciones de TPH presentes en las muestras de suelo.

10.2.4 Instrumentos de investigación

- Fichas de investigación
- Ficha de laboratorio

10.2.5 Materiales y equipos

- Asas calibradas
- Tubos de solución salina
- Medios de cultivo (tioglicolato, agar macconkey, agar nutritivo, caldo BHI, Agar Urea, Agar MIO, Agar TSI, Agar LIA y Agar citrato.)
- Cajas petri
- Agua peptonada
- Agua destilada
- Pipeta de vidrio
- Puntas micropipeta (100 μ L y 1000 μ L)
- Gradilla
- Aceite de inversión

- Cristal violeta
- Lugol
- Alcohol cetona
- Safranina
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Vortex
- Incubadora
- Autoclave
- Cabina de flujo laminar
- Microscopio óptico
- Nevera
- Congelador
- Balanza

10.3 Objetivo 1: Cuantificar, aislar y caracterizar microorganismos nativos del suelo contaminado con hidrocarburos procedentes de la parroquia Dayuma, provincia de Orellana.

10.3.1 Actividad 1: Recolección de tierra

10.3.1.1 Georreferenciación del sitio de muestreo

Ubicación: Dayuma

Provincia: Orellana

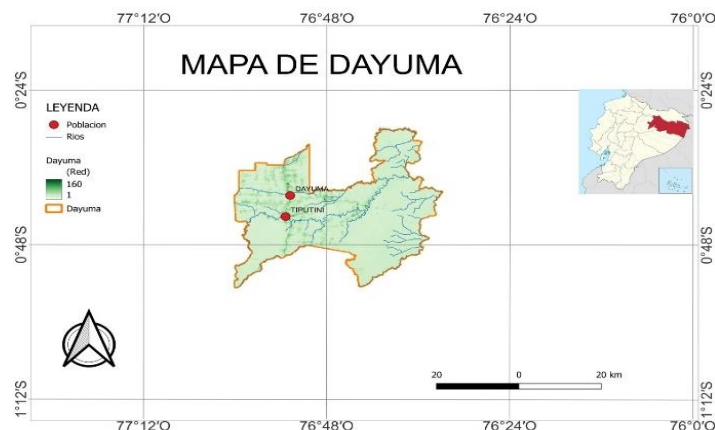
Temperatura: 27° - 35° C.

Precipitación: 3300mm

Coordenadas:

X: 290607.41 m

Y: 9928104.02 m

Figura 1*Georreferenciación del lugar de muestreo***Elaborado por:** Los autores, 2023.**10.3.1.2 Muestreo del suelo**

En base a lo establecido en la Tabla 7, se determinó el número mínimo de puntos de muestreo para cada área de potencial interés dentro del predio de estudio (Ministerio del Ambiente, 2014). Dicha tabla abarcó tanto los puntos de muestreo superficiales (área de toma de muestras compuestas) como los de profundidad, conformando el número total de puntos de muestreo necesarios.

Tabla 7*Número mínimo de puntos de muestreo para el Muestreo de Identificación.*

Área de potencial interés (Ha)	Puntos de muestreo en tota
0,1	4
0,5	6
1	9
2	15
3	19
4	21
5	23
10	30
15	33
20	36
25	38
30	40
40	42

50	44
100	50

Fuente: Ministerio del Ambiente (2014)

Para recolectar muestras representativas de suelo contaminado, se empleó el método aleatorio sistemático, que asegura una selección imparcial y uniforme de los puntos de muestreo. Se estableció una parcela de 10 m² y se distribuyeron puntos de muestreo de forma aleatoria dentro de esta área. Luego, se llevó a cabo una excavación de 30 cm de profundidad en cada punto seleccionado.

Se recolectaron cuatro muestras de suelo, cada una con un peso de 5 kg, las cuales fueron colocadas en saquillos de polietileno con un diámetro de poro de 0,8 µm para evitar la contaminación cruzada. Posteriormente, se mezclaron de manera homogénea para obtener cuatro submuestras de 1 kg cada una. Estas submuestras se depositaron en fundas ziploc debidamente etiquetadas con información detallada, como el lugar de recolección, la fecha, el tipo de muestra, el responsable y el número de muestra correspondiente.

Las muestras de suelo fueron transportadas al laboratorio de Microbiología y Bacteriología de la Universidad Central del Ecuador (**ver anexo 1**). En este laboratorio, se llevó a cabo el proceso de aislamiento de los microorganismos nativos presentes en el suelo contaminado con hidrocarburos provenientes de la Amazonía ecuatoriana.

Utilizando las muestras de suelo restantes, se llevó a cabo un proceso de remediación mediante la implementación de diversos procedimientos de tratamiento.

10.3.2 Actividad 2. Diluciones seriadas

10.3.2.1 Preparación de medios de cultivo empleados

Se utilizó caldo de cultivo (Tioglicolato) (BMI Laboratorios) y agar (agar agar) para bacterias. El agar y el caldo de cultivo fueron preparados teniendo en cuenta las etiquetas proporcionadas por la casa productora de cada medio utilizado en el laboratorio (**ver anexo 2,3,4,5**).

10.3.2.2 Control de medios de cultivo

Con la finalidad de evaluar el correcto funcionamiento de los medios de cultivo utilizados, se llevó a cabo un control de medios de cultivo. Para esto se utilizó el medio tioglicolato, que es un agar enriquecido que facilita el desarrollo de diversos microorganismos (Rodríguez Pulido, 2022). Asimismo, se utilizó el agar Mac Conkey, un medio selectivo diferencial que impide el crecimiento de bacterias Gram positivas y permite distinguir las Gram negativas. En ambos medios de cultivo se inoculó una cepa de *Enterococcus* para obtener un control de calidad positivo y evaluar su crecimiento apropiado.

De la misma forma, para establecer un control negativo, se utilizaron los mismos medios de cultivo en los cuales no se inoculó ningún microorganismo; esto se lo realizó con el objetivo de asegurar que los medios de cultivo no estén contaminados al momento de realizar la siembra (**ver anexo 6,7,8**).

10.3.2.3 Diluciones Seriadas

Para el aislamiento de los microorganismos nativos, se empleó la técnica de dilución seriada misma que se utilizó para cuantificar los microorganismos en una placa de cultivo. La muestra de suelo se diluyó 1 en 10. Es decir, 25g de suelo en 125 ml de agua peptonada (10^{-1}), 1g de la disolución anterior en 9 mL de agua peptonada (10^{-2}), así se diluyó hasta 10^{-5} (**ver anexo 9,10,11,12,13**).

Se sembraron las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} por duplicado, con una micropipeta se tomó 0,1 mL (100 uL) de cada dilución y se sembró en cajas Petri con medio Agar tioglicolato por extensión en placa o placa extendida (**ver anexo 13**). Por último, se llevó a una incubación a 37 ± 2 °C durante 48 horas en condiciones óptimas para el crecimiento bacteriano.

10.3.3 Actividad 3. Cuantificación

Para determinar el número de UFC/g en cada una de las muestras, se contaron el número de colonias presentes en la dilución contable (10^{-3}) (**ver anexo 14**). Se consideró que una colonia era equivalente a una UFC/g. Este valor representaba la cantidad de UFC/g en el volumen de la gota que fue depositada por el replicador. Una vez determinado el N° de colonias en 1 ml (100 µL), el resultado se multiplicó por el factor de dilución utilizado y se dividió por el volumen en ml de la muestra sembrada. De esta manera, se logró calcular la concentración de UFC en 1 ml (100 uL) de la muestra.

$$UFC = \frac{N^{\circ} \text{ de } \frac{UFC}{g} \times \text{FACTOR DE DILUCIÓN}}{\text{mL de la muestra sembrada}}$$

Donde:

UFC: Unidad formadora de colonias.

N° de UFC/ml: número de colonias.

Factor de dilución: número de veces (concentración final).













mL de la muestra sembrada: Cantidad de dilución sembrada (en la placa).

10.3.4 Actividad 4. Caracterización macroscópica

En el estudio de la caracterización macroscópica, se empleó el método propuesto por MacFaddin en 2006. Durante esta etapa, se examinaron las colonias que se formaron en la superficie del medio de cultivo, analizando tanto la parte superior como la inferior de la placa de Petri (**ver anexo 15**). El objetivo fue identificar las características macroscópicas de las colonias y distinguir aquellas que son comunes y específicas para cada grupo bacteriano. Mediante este enfoque, se logró identificar y clasificar los diferentes morfotipos en función de sus características macroscópicas. En consecuencia, se consideraron los siguientes criterios:

Figura 2

Aspectos más comunes de la diversidad colonias microbianas aisladas

Forma	Borde	Elevación	Superficie
 Puntiforme	 Entero	 Plana	Lisa o rugosa
 Circular	 Ondulado	 Elevada	Mateo o brillante
 Rizoide	 Lobulado	 Convexa	Seca o cremosa
 Irregular		 Crateriforme	Invasiva o superficial
		 Acuminada	

Elaborado por: Los autores, 2023.

10.3.5 Actividad 5. Aislamiento axénico bacteriano.

Después de obtener un resultado de recuento de las colonias presentes en los medios de cultivo, se procedió a la siembra en un nuevo medio de cultivo, para la obtención de cultivos axénicos o puros de las colonias morfológicamente diferentes encontradas. El aislamiento se llevó a cabo en medio tioglicolato y se utilizó un asa bacteriológica esterilizada para obtener una muestra de las colonias y sembrarla mediante el método de agotamiento (**ver anexo 16**). Las cajas con crecimiento puro se colocaron en la incubadora a una temperatura constante de 37 ± 2 °C durante un período de 24 a 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo requerido, las placas se emplearon para la caracterización, identificación y crioconservación.

10.3.6 Actividad 6. Caracterización microscópica (Tinción de Gram)

La tinción de Gram es una técnica eficaz y rápida que nos brindó la capacidad de distinguir entre dos categorías de bacterias: las bacterias Gram positivas y las bacterias Gram negativas (Rodríguez & Arenas Roberto, 2018).

La técnica de tinción Gram se fundamenta en las diferencias estructurales de las bacterias, de tal manera que las bacterias Gram positivas adquieren un color morado en la tinción de Gram debido a que el colorante se retiene en la capa densa de peptidoglucano que rodea a la célula, mientras que en las bacterias Gram negativas no retienen el cristal violeta durante la tinción de Gram por su capa de peptidoglucano más delgada y por ende toma el color del colorante final de contraste safranina y se observan con un color rojo o rosado.

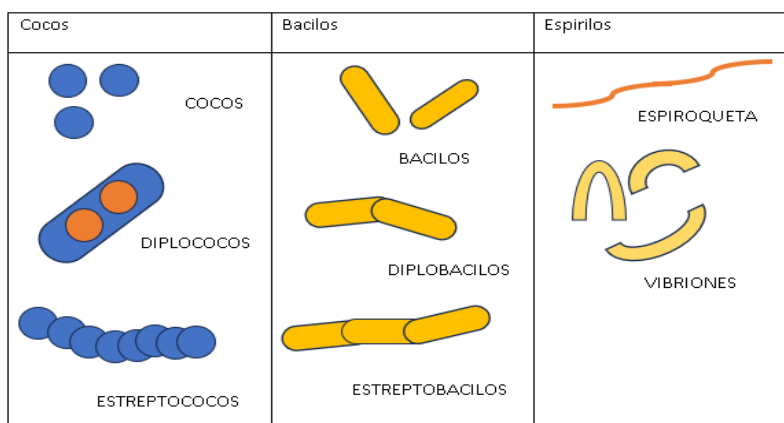
Se aplicó la técnica de tinción de Gram sobre frotis de la bacteria de interés. En este proceso, se agregó una pequeña gota de solución salina sobre una lámina de portaobjetos y se procedió a diluir la colonia microbiana de interés, se fijó calentándola, el frotis fijado se tiñó con Cristal Violeta durante un minuto, se enjuagó con agua destilada y se cubrió con Lugol durante otro minuto, se volvió a enjuagar con agua destilada y se procedió a decolorar con alcohol-acetona, después de escurrir el exceso de líquido, se cubrió con safranina durante un minuto, finalmente se realizó un último lavado con agua destilada y se dejó secar cerca del mechero (**ver anexo 17**). Las placas portaobjetos se observaron en un microscopio óptico utilizando aceite de inmersión, con un aumento de 100X, para visualizar la forma de las bacterias y detectar la presencia o ausencia de esporas.

10.3.6.1 Tinción Gram

Para la caracterización microscópica se tuvo en cuenta los siguientes criterios la cual está constituida por Forma, Agrupación y Tinción de Gram.

Figura 3

Morfología microscópica de las bacterias



Elaborado por: Los autores, basado en: Rodríguez 2018

10.3.7 Actividad 7. Determinación bioquímica de las bacterias.

En las pruebas bioquímicas, se emplearon diversos medios de cultivo específicos para evaluar distintos aspectos metabólicos de microorganismos. Estos medios incluyeron el Agar MacConkey para la detección de bacterias gramnegativas que fermentan lactosa, el Agar Lisina y Hierro para investigar la capacidad de algunas bacterias para desdoblar la lisina y producir reacciones de sulfuro, el Agar TSI (triple azúcar hierro) para analizar la fermentación de azúcares y la producción de sulfuro de hidrógeno, el Agar SIM para evaluar la producción de sulfuro, indol y motilidad bacteriana, el Agar Citrato para determinar la capacidad de las bacterias para utilizar el citrato como única fuente de carbono, y el Agar Úrea para verificar la actividad de la enzima ureasa. Estos medios de cultivo proporcionaron información valiosa sobre las características metabólicas y bioquímicas de los microorganismos estudiados, contribuyendo así al entendimiento de su comportamiento y funciones.

10.4 Objetivo 2: Realizar una crioconservación mediante congelamiento de las cepas recuperadas a partir del suelo contaminado con hidrocarburos, con el fin de conservarlas a largo plazo y permitir su utilización en estudios futuros para determinar su capacidad degradadora de hidrocarburos.

10.4.1 Actividad 1. Preparación los tubos de crioconservación con glicerol y el medio BHI.

Se desarrolló una solución acuosa con preservante glicerol, para conservar las bacterias en fase de crecimiento logarítmico (24 horas de incubación) a partir del medio axénico. Los componentes empleados se encuentran descritos en la tabla 10.

10.4.2 Actividad 2. Inoculación de bacterias

Se identificó la colonia específica y se transfirió a tubos de Eppendorf mediante el uso de un asa metálica previamente esterilizada. Los tubos fueron sometidos a una agitación vigorosa de 15 segundos en el vortex para garantizar una distribución homogénea de las bacterias en el medio.

10.4.3 Actividad 3. Almacenamiento de los tubos preparados

Finalmente, los tubos Eppendorf fueron llevados a un congelador con una temperatura de -20°C, lo cual garantiza investigaciones futuras. **(ver anexo 24).**

Tabla 8*Solución para la conservación de las bacterias aisladas*

Medio líquido (Tioglicolato)	5 mL
Agua destilada	200 mL
Glicerina	2 gotas de la pipeta de pasteur

Elaborado por: Los autores, 2023.**11 Diseño experimental**

Se llevó a cabo un diseño experimental para evaluar el efecto del hidrocarburo en el suelo, el cual nos ayudará a conocer qué tratamiento es más efectivo.

11.1 Objetivo 3: Determinar el efecto de remoción de hidrocarburos en los suelos contaminados.**11.1.1 Actividad 1. Preparación de muestras de suelo utilizando contenedores de plástico.**

En este proyecto de investigación se evaluó la capacidad de remediación de los microorganismos que se encuentran en suelos que han sido previamente tratados, como se describe a continuación:

Tabla 9*Tratamientos aplicados en la unidad de experimentación durante la investigación.*

N° Tratamiento	Tipo de tratamiento
T ₁	Suelo (10 lb) + Hidrocarburo (250 mL) + Agua (500 mL).
T ₂	Suelo (10 lb) + Hidrocarburo (250 mL) + Agua (500 mL) + aireación (movimiento de tierra)
T ₃	Suelo (10 lb) + Hidrocarburo (250 mL) + Agua (500 mL) + Melaza (500 mL)

Elaborado por: Los autores, 2023.

Se llevaron a cabo tres tratamientos. El tratamiento 1 se consideró como el grupo de control, en el cual se preparó una muestra de suelo que contenía agua e hidrocarburos (**ver anexo 25**).

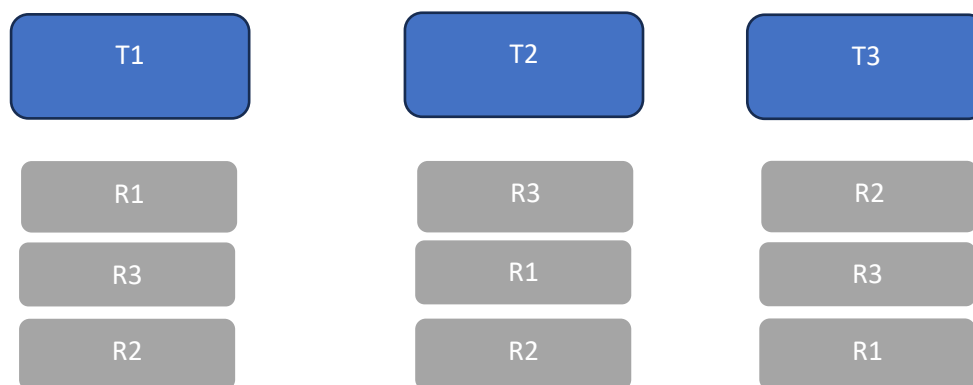
En el tratamiento 2 se aplicó el oxidación-reducción (redox), el cual se considera una técnica de volatilización pasiva para contaminantes volátiles. Según Manrique & Guisella (2021), este método consiste en promover la volatilización mediante la remoción periódica del suelo. En este caso, se realizó la remoción del suelo cada 2 días durante un mes, con el objetivo de promover la liberación de hidrocarburos presentes en forma volátil (**ver anexo**

26). Posteriormente, se llevó a cabo una prueba de TPHs para evaluar los niveles de contaminación en el suelo tratado.

En el tratamiento 3 se aplicó la adición de melaza, la cual se basa en impulsar el crecimiento de microorganismos con la habilidad de descomponer sustancias contaminantes (proceso de biorremediación), se puede considerar la optimización de las condiciones del suelo para fomentar la eficacia de los microorganismos existentes o la introducción de nuevas especies. Para promover las acciones bióticas, se pueden mejorar condiciones específicas del suelo, como añadir nutrientes, agua, oxígeno y ajustar el pH (Vergaray Ruiz, 2022). En este tratamiento, se introdujo agua con melaza para proporcionar nutrientes adicionales a los microorganismos presentes en el suelo contaminado con hidrocarburos (**ver anexo 27**). Posteriormente, se realizaron pruebas de TPHs para evaluar el grado de contaminación en el suelo tratado. Finalmente, se llevó a cabo una comparación con los resultados obtenidos en los tratamientos anteriores para determinar la eficacia de la metodología microbiológica en la remediación del suelo contaminado.

11.1.2 Actividad 2. Desarrollo del experimento mediante la contaminación del suelo con hidrocarburos.

Tomando en cuenta las 3 muestras de suelo contaminado con hidrocarburo, se organizó en 9 unidades experimentales con tres repeticiones. Se tomo en cuenta que en cada tratamiento los bloques tuvieran las mismas condiciones con respecto a cantidad de agua, petróleo, suelo y oxidación-reducción (redox) o adicción de melaza para los tratamientos 1 y 2, esto ayudar a las bacterias a acelerar su metabolización.



Elaborado por: Los autores, 2023.

11.1.3 Actividad 3. Evaluación de la capacidad degradadora de las bacterias.

11.1.3.1 Análisis ANOVA y TUKEY

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con el propósito de discernir diferencias significativas entre las medias de los tratamientos. Tras confirmar esta disparidad significativa, se aplicó el método de comparaciones múltiples de Tukey para identificar de manera precisa los pares de grupos cuyas medias presentan diferencias notables. Este enfoque exhaustivo no solo permite una evaluación profunda de las disparidades entre los grupos, sino que también proporciona una comprensión minuciosa de las relaciones comparativas entre las medias, fortaleciendo así la interpretación sólida y confiable de los resultados obtenidos.

12 ANALISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

12.1 Diluciones seriadas

En el proceso de diluciones, se realizaron varias combinaciones de dilución, desde 10^{-1} hasta 10^{-5} , con el propósito de mejorar la precisión de los resultados. Se efectuaron duplicados de las diluciones para obtener datos más confiables, como se muestra en la tabla 14. El objetivo principal era obtener colonias bacterianas individuales dentro de un rango de 30 a 300 unidades formadoras de colonias (UFC) (Tipantuña Chiluisa, 2020). Para lograr esto, se tomó en cuenta la dilución de 10^{-3} , ya que proporciona el rango deseado de UFC. Esta dilución específica fue seleccionada con el fin de permitir un conteo preciso de las colonias en las etapas posteriores del proceso.

Tabla 10

Conteo de las UFC de cada dilución (10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3}).

Dilución 10^{-5}	M1	M2	M3	M4
Primero	0	0	0	0
Duplicado	1	0	1	1
Dilución 10^{-4}	M1	M2	M3	M4
Primero	2	1	3	4
Duplicado	5	6	8	15
Dilución 10^{-3}	M1	M2	M3	M4
Primero	36	38	35	36
Duplicado	35	35	37	37

Elaborado por: Los autores, 2023.

Tabla 11*Cálculo de la dilución 10⁻³*

Muestra	N° de colonias	Procedimiento
M1 (10 ⁻³)	35	$\frac{UFC}{g} = \frac{35\ ufc \times 10^4}{0.1\ g} = 3.5 \times 10^5\ ufc/g$
M2 (10 ⁻³)	35	$\frac{UFC}{g} = \frac{35\ ufc \times 10^4}{0.1\ g} = 3.5 \times 10^5\ ufc/g$
M3 (10 ⁻³)	37	$\frac{UFC}{g} = \frac{37\ ufc \times 10^4}{0.1\ g} = 3.7 \times 10^5\ ufc/g$
M4 (10 ⁻³)	37	$\frac{UFC}{g} = \frac{37\ ufc \times 10^4}{0.1\ g} = 3.7 \times 10^5\ ufc/g$

Elaborado por: Los autores, 2023.

En la tabla (15), se presenta el cálculo de la dilución 10⁻³, y se muestra el valor obtenido a través del conteo de colonias individuales. Los resultados de la muestra 1 y 2 fueron de $3.5 \times 10^5\ UFC/g$, mientras que los de la muestra 3 y 4 fueron de $3.7 \times 10^5\ UFC/g$. Estos valores indican la cantidad de células de un organismo presente en el suelo.

A partir de los organismos obtenidos, se procedió a aislar UFC de diferente morfología (morfotipos), para obtener cultivos puros o axénicos, permitiendo la caracterización de los mismos.

12.2 Caracterización macroscópica

Las colonias bacterianas presentan características distintivas en cuanto a su tamaño, forma, textura y, en ocasiones, color, lo que facilita la diferenciación de bacterias en cultivos (Tamayo Rivera, 2021). Sin embargo, estas características macroscópicas no son suficientes para lograr una identificación completa de las bacterias. Es necesario complementar el estudio mediante la microscopía y el análisis de sus características bioquímicas. Mediante la combinación de la observación macroscópica, la microscopía y el análisis bioquímico, es posible lograr una identificación más precisa de las bacterias presentes en un cultivo.

Tabla 12

Caracterización macroscópica del suelo ($M_4 10^{-3}$ y $M_2 10^{-3}$)

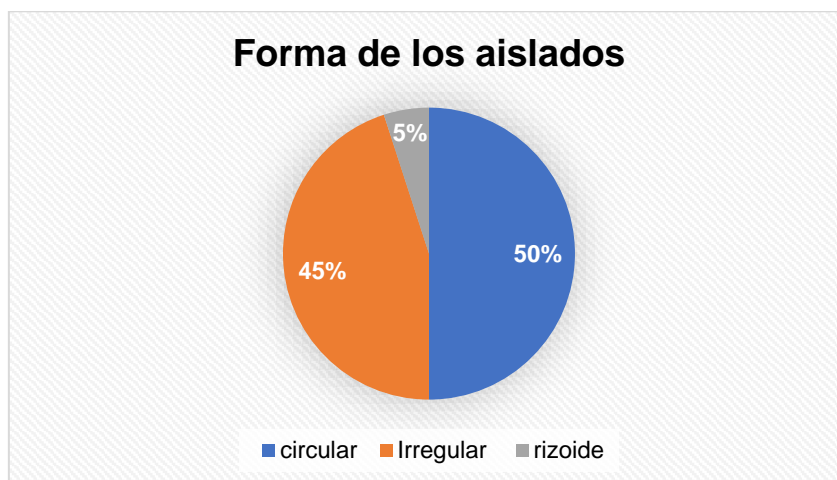
Caracterización macroscópica ($M_4 10^{-3}$)					
N°	Forma	Color	Borde	Elevación	Superficie
1	Circular	Beige	Entero	Convexa	Lisa
2	Irregular	Gris	Ondulado	Plana	Rugosa
3	Rizoide (Estrella)	Gris	Ondulado	Plana	Rugosa seca
4	Irregular	Gris	Ondulado	Plana	Rugosa seca
5	Irregular	Beige	Ondulado	Plana	Seca rugosa
6	Irregular	Amarillo (pálido)	Ondulado	Elevada	Lisa
7	Circular	Amarillo (pálido)	Ondulado	Elevada	Lisa
8	Circular	Blanco	Entero	Plana	Seca
9	Circular	Blanco	Entero	Elevada	Lisa
10	Circular	Blanco	Entero	Elevada	Lisa
Caracterización macroscópica ($M_2 10^{-3}$)					
11	Circular	Amarillo	Entero	Convexa	Lisa
12	Circular	Blanca	Entero	Convexa	Lisa
13	Circular	Naranja	Entero	Elevada	Seca
14	Circular	Naranja	Entero	Elevada	Seca
15	Circular	Beige	Entero	Elevada	Lisa
16	Irregular	Blanco	Ondulado	Plana	Seca y rugosa
17	Irregular	Beige	Ondulado	Elevada	Seca
18	Irregular	Beige	Ondulado	Elevada	Lisa

Elaborado por: Los autores, 2023.

La Tabla 12 presenta las características macroscópicas de la disolución ($M_4 10^{-3}$) y ($M_2 10^{-3}$) obtenidas en el laboratorio, donde se aislaron 18 morfotipos diferentes a partir del medio agar tioglicolato, y se llevaron a cabo descripciones macroscópicas y microscópicas de cada uno de ellos, tal como se muestra en las **figuras (4,5,6,7,8)**. Estas características macroscópicas incluyen su forma, color, borde, elevación y superficie.

Figura 4

Porcentaje de la forma que presentaron las colonias aisladas

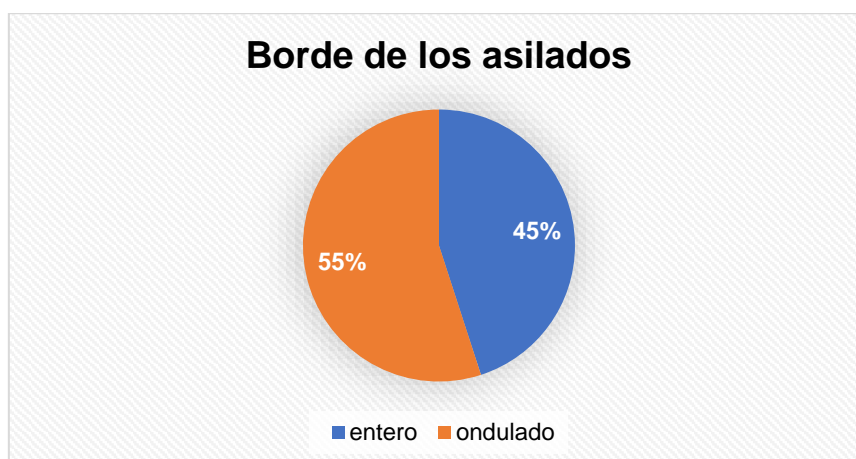


Elaborado por: Los autores, 2023.

En la Figura 4, se puede observar que el 50% de los 18 morfotipos aislados se caracterizan por tener colonias circulares, lo que implica que su apariencia macroscópica es redonda y con bordes bien definidos (Noriega Luna, 2022). Además, el 45% de los morfotipos aislados se describen como colonias irregulares, lo que significa que no tienen una forma definida y presentan un contorno poco claro. Por último, el 5% de los morfotipos aislados corresponden a colonias rizoides, las cuales muestran un patrón de crecimiento filamentoso similar a raíces o raicillas (Núñez & Dos Santos, 2020).

Figura 5

Porcentaje del borde que presentaron las colonias aisladas



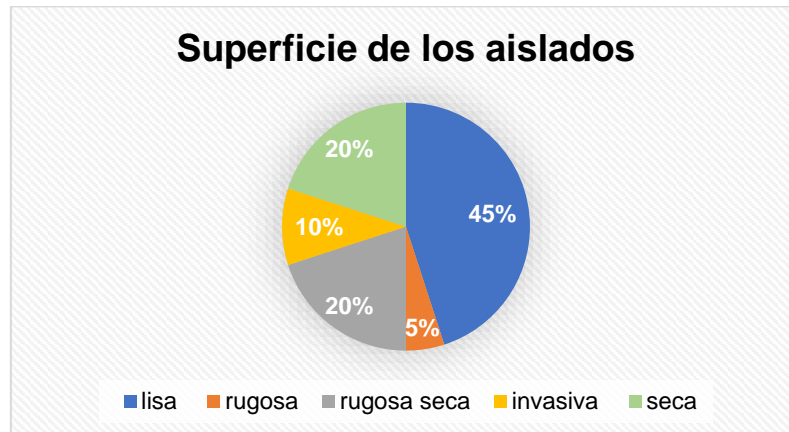
Elaborado por: Los autores, 2023.

La Figura 5, muestra que el 55% de los 18 morfotipos aislados se caracterizan por tener colonias con bordes enteros, lo que significa que presentan un contorno liso y continuo, sin interrupciones ni irregularidades. Estas colonias tienen un margen uniforme y bien

definido, sin proyecciones ni identificaciones en su perímetro (Noriega Luna, 2022). Por otro lado, el 45% de los morfotipos aislados exhiben colonias con bordes ondulados, lo que implica que tienen un contorno con curvas suaves y regulares en lugar de ser recto o liso. Estas colonias muestran una serie de ondulaciones o sinuosidades a lo largo de su perímetro (Romero, Cobo, Pérez, & Polo, 2020).

Figura 6

Porcentaje de la superficie que presentaron las colonias aisladas

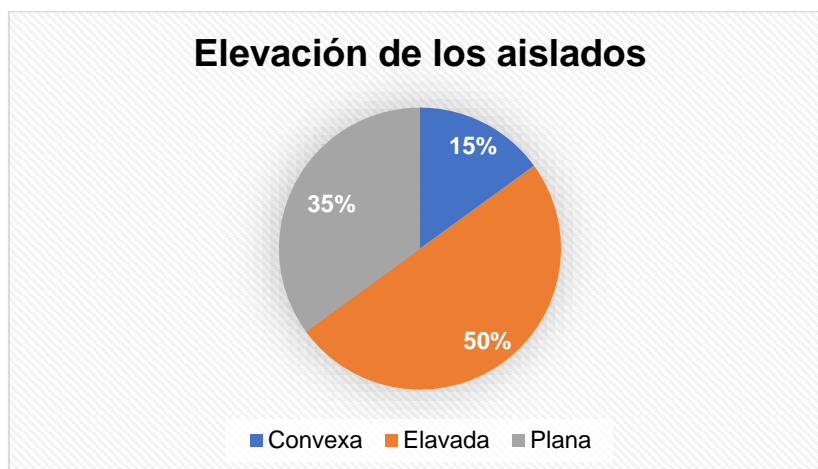


Elaborado por: Los autores, 2023.

Según la Figura 6, se puede observar que de los 18 morfotipos aislados, el 45% se caracteriza por tener colonias con superficie lisa, lo que implica una apariencia suave y uniforme en su estructura externa (Sánchez Riofrio, 2022). Por otro lado, el 20% de los morfotipos exhiben colonias con superficies rugosas y secas, lo que significa que la apariencia externa de estas colonias presenta una textura irregular y seca, sin presencia de humedad. Además, un 20% de los morfotipos se caracteriza por tener una superficie seca, lo que indica que la capa externa de estos organismos o estructuras no muestra signos visibles de humedad o líquido. El 10% de los morfotipos presenta una superficie invasiva, mientras que el 5% muestra una superficie rugosa, con protuberancias, arrugas o texturas ásperas visibles a simple vista.

Figura 7

Porcentaje de la elevación de las cepas bacterianas aisladas

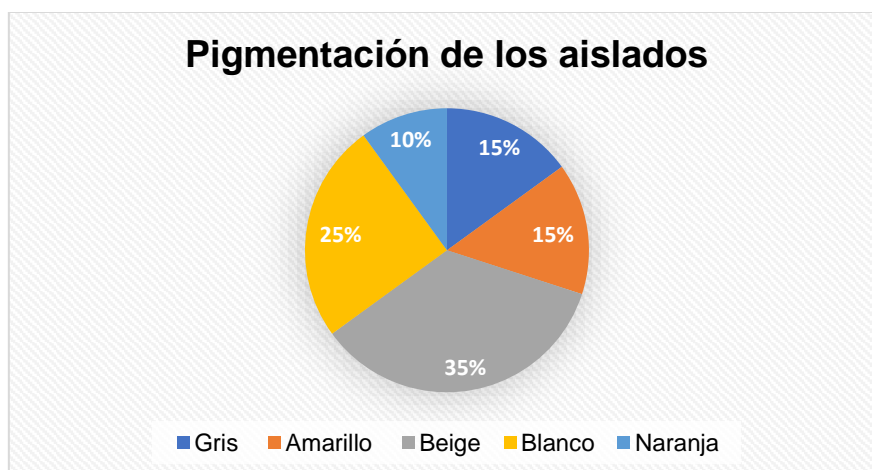


Elaborado por: Los autores, 2023.

La Figura 7 indica que hay una diversidad en las características de elevación de las colonias de los morfotipos aislados. La mitad de ellos tienen elevaciones, el 35% presenta elevaciones planas y el 15% exhibe elevaciones convexas. Estas características distintivas en la superficie de las colonias son utilizadas para describir y clasificar los diferentes morfotipos identificados.

Figura 8

Porcentaje de la pigmentación de las cepas bacterianas aisladas



Elaborado por: Los autores, 2023.

La información proporcionada en la Figura 8 muestra la pigmentación de los 18 morfotipos aislados de la siguiente manera: un 35% de los morfotipos presentan un color beige, un 15% muestran un color amarillo, otro 15% exhiben un color naranja, un 10% tienen

un color gris y finalmente un 25% muestran una pigmentación blanca. Estos datos se utilizan para describir y clasificar los diferentes morfotipos aislados según su apariencia de color.

12.3 Tinción Gram (microscópica)

Las colonias bacterianas exhiben rasgos distintivos en términos de su tamaño, forma, textura e incluso color, lo cual simplifica la distinción de bacterias en cultivos mezclados. Sin embargo, estas características no son suficientes para lograr una identificación completa, ya que se requiere llevar a cabo un examen microscópico y analizar sus propiedades bioquímicas para obtener una identificación precisa (Zimmermann, 2022). Por esta razón, en el caso específico de la tabla (13), se utilizó el método de tinción de Gram para caracterizar las bacterias, permitiendo observar su morfología microscópica y distinguir entre tinciones Gram positivas y Gram negativas.

Tabla 13

Caracterización microscópica de la M4 (10^{-3}) y M2 10^{-3} .

Número	Muestra	Tinción de Gram		Nombre microscópico	Anexos
		Positivo	Negativo		
1	M4 (10^{-3}) 1	0	1	Bacilos	Ver anexo 28
2	M4 (10^{-3}) 2	0	1	Bacilos	Ver anexo 29
3	M4 (10^{-3}) 3	0	1	Bacilos	Ver anexo 30
4	M4 (10^{-3}) 4	0	1	Bacilos	Ver anexo 31
5	M4 (10^{-3}) 5	0	1	Bacilos	Ver anexo 32
6	M4 (10^{-3}) 6	0	1	Bacilos	Ver anexo 33
7	M4 (10^{-3}) 7	0	1	Bacilos (esporulados)	Ver anexo 34
8	M4 (10^{-3}) 8	0	1	Estreptobacilos	Ver anexo 35
9	M4 (10^{-3}) 9	0	1	Bacilos	Ver anexo 36
10	M4 (10^{-3}) 10	0	1	Bacilos	Ver anexo 37
11	M2 (10^{-3}) 1	0	1	Bacilos	Ver anexo 38
12	M2 (10^{-3}) 2	0	1	Bacilos	Ver anexo 39
13	M2 (10^{-3}) 3	0	1	Bacilos	Ver anexo 40
14	M2 (10^{-3}) 4	0	1	Bacilos	Ver anexo 41
15	M2 (10^{-3}) 5	0	1	Bacilos	Ver anexo 42
16	M2 (10^{-3}) 6	0	1	Bacilos	Ver anexo 43
17	M2 (10^{-3}) 7	0	1	Bacilos	Ver anexo 44
18	M2 (10^{-3}) 8	0	1	Bacilos	Ver anexo 45

Elaborado por: Los autores, 2023.

Tabla 14

Características microscópicas de los Bacilos Gram negativos por el método de Tinción de Gram

Identificación por Tinción de Gram	Identificación por bibliografía
 <p data-bbox="129 779 592 808">Elaborado por: Los autores, 2023.</p>	 <p data-bbox="671 792 1182 822">Fuente ((Science Photo Library, 2013)</p>

Elaborado por: Los autores, 2023.

La tabla 14, presenta las características relevantes mediante el método de Tinción de Gram, donde la imagen en la parte izquierda ilustra los resultados experimentales, exhibiendo la aparición de bacilos de tonalidad rosada con rasgos cortos, aglomerados de forma aislada y en grupos, y ausencia de estructuras de esporulación. Por su parte, la figura en el extremo derecho representa las atribuciones distintivas de las bacterias Gram negativas relacionadas con (Science Photo Library, 2013).

Figura 9

Porcentaje de las características microscópicas de las colonias aisladas.



Elaborado por: Los autores, 2023.

La forma de las bacterias bajo el microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Se clasifican en diferentes formas, como cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndricas o en forma de bastones, ya sean rectos o curvos) y espirilos (en forma de espiral) (Plaza Avellán & Intriago Quintana, 2020). De las 18 bacterias seleccionadas, se observó que

la forma más predominante fue la de bacilos, con un 100% de presencia. Al aplicar una tinción diferencial, como la tinción de Gram, se pudo determinar que la mayoría de estos bacilos eran Gram negativos, representando un 100%.

12.4 Crioconservación de las bacterias aisladas

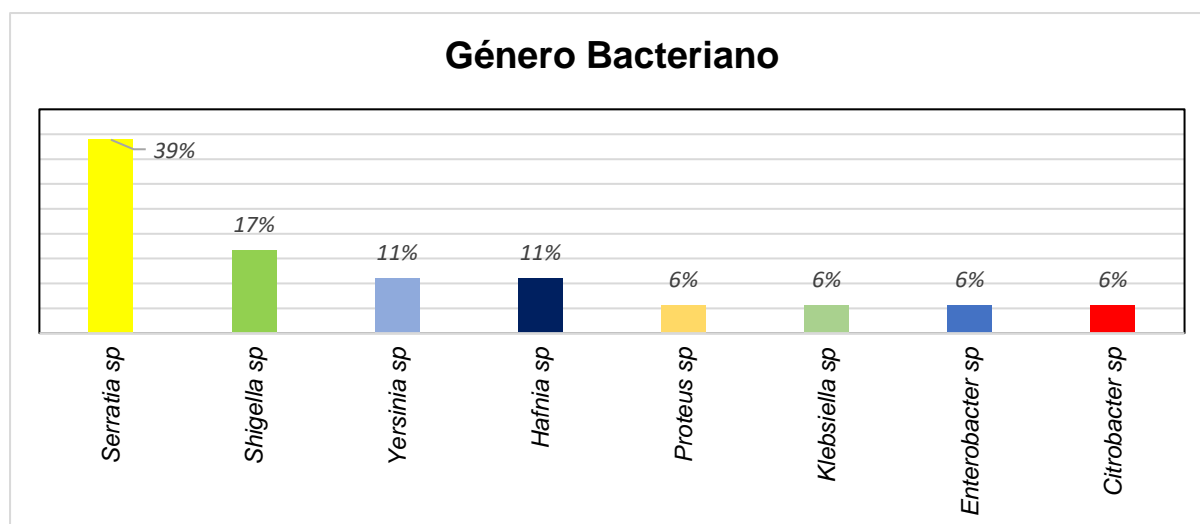
Se realizó una crioconservación de 18 cepas bacterianas aisladas (ver anexo 46), las cuales fueron guardadas en un congelador a -20°C . lo cual ayuda a frenar su actividad metabólica y mantener su viabilidad, esto permitirá que las cepas mantengan sus características biológicas y genéticas intactas, lo que resulta crucial para futuras investigaciones.

12.5 Baterías bioquímicas

En el análisis bioquímico se aplicó a las 18 cepas bacterianas Gram negativas obtenidas de muestras de suelo contaminado con petróleo en la provincia de Orellana (Dayuma), se detectaron varias especies diferentes (ver figura 10). La especie más abundante fue *Serratia Sp*, lo que corresponde al 39% de las muestras. Además, se identificaron *Shigella Sp* con un 17% de las muestras, mientras que *Yersinia Sp* y *Hafnia Sp* se encontraron en el 11% cada una. Otras especies también estuvieron presentes, como *Enterobacter Sp*, *Citrobacter Sp*, *Proteus Sp* y *Klebsiella Sp*, cada una de ellas detectada un 6%. Estos resultados destacan la gran diversidad de bacterias nativas que coexisten en el suelo contaminado con petróleo en esta región.

Figura 10

Porcentaje de bacterias identificadas



Elaborado por: Los autores, 2023.

12.6 Cantidad de Hidrocarburo presente el suelo (peso seco).

Tabla 15

TPHs iniciales y finales.

Hidrocarburos Totales de Petróleo en peso seco (mg/kg)	TPHs iniciales	TPHs finales	Parámetros permisibles	Porcentaje de degradación de TPHs	Método utilizado
TPHs	33026	7484	Suelo uso Agrícola <2500 mg/kg	Suelo uso Industrial <4000 mg/kg 77 %	M-GO-AM-62 MÉTODO INFRARROJO

Elaborado por: Los autores, 2023.

La tabla 15, proporciona información detallada sobre los valores iniciales y finales de los TPHs. En la fase inicial, los niveles de TPHs se situaron en 33026 mg/kg, y al concluir el experimento, el tratamiento 3 registró una notable reducción, con una cantidad de 7484 mg/kg de TPHs degradados. Esta disminución representa una disminución del 77 % en el contenido total de TPHs. Este cambio se atribuye a la influencia positiva de los metabolitos bacterianos y la adición de nutrientes extra, como la melaza, los cuales desempeñaron un papel crucial en el proceso de degradación de los hidrocarburos. En este contexto, el consorcio bacteriano Enterobacteriaceae, al multiplicarse con mayor rapidez, contribuyó significativamente a acelerar la descomposición de los TPHs.

12.7 Análisis de Varianza (ANOVA)

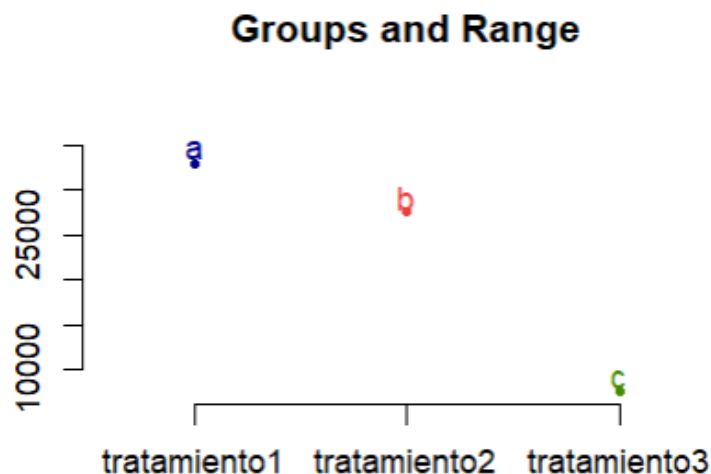
Análisis de Varianza (ANOVA)						Tukey (5 %)	
F. V	GL	SS	CM	F	P-valor	Tratamientos	Media
Tratamientos	2	1.085e+09	5422632 16	1238 672	<2e-16	T1	33030
Error	6	2.627e+03	438			T2	27534
Total	8	1.09e+09				T3	7496

Elaborado por: Los autores, 2023.

Se observa que el valor p de la tabla ANOVA es <2e-16. Dado que es menor que 0.05, se tiene evidencia estadística para rechazar H_0 , es decir, que existen diferencias en al menos uno de los tratamientos. Por tanto, se realiza la prueba de TUKEY para determinar que medias de grupos son diferentes.

Figura 11

Análisis Tukey 5% de los tratamientos.



Elaborado por: Los autores, 2023.

En la figura 11 se muestra que existe una diferencia estadística significativa entre la degradación del suelo promedio de cada tratamiento al nivel de significancia al 0.05. Concluyendo que el mejor tratamiento es el tratamiento 3, debido a que existe mayor degradación de hidrocarburo en el suelo y la validez de la data.

12.8 Análisis de las variables de la muestra

12.8.1 pH de la muestra contaminada con hidrocarburo

En siguiente tabla se describe el análisis de pH de la muestra contaminada con hidrocarburo.

Tabla 16

Análisis de ANOVA y Tukey al 5% del pH de la muestra.

Análisis de Varianza (ANOVA)						Tukey (5 %)	
F. V	GL	SS	CM	F	P-valor	Tratamientos	Media
Tratamientos	8	0.01	0.00080208	2.29	0.03	T1	8.16
Error	99	0.03	0.00035101			T2	8.18
Total	107	0.04	0.00038474			T3	8.18

Elaborado por: Los autores, 2023.

En la Tabla 16, se presenta la media de los valores de pH para cada tratamiento. Destacan los resultados de T2 y T3, los cuales registran el pH más elevado en el proceso con valores de 8.18, mientras que T1 tiene el pH más bajo con un valor de 8.16. Estas variaciones en los valores de pH se atribuyen a la adición de redox y melaza en estos tratamientos, lo que ha contribuido a mantener un pH similar entre ellos.

12.8.2 Humedad de la muestra contaminada con hidrocarburo

En la siguiente tabla se describe el análisis de la humedad de la muestra contaminada con hidrocarburo.

Tabla 17

Análisis de ANOVA y Tukey al 5% de la humedad de la muestra.

Análisis de Varianza (ANOVA)						Tukey (5 %)	
F. V	GL	SS	CM	F	P- valor	Tratamientos	Media
Tratamientos	8	1440.74	180.09	16.85	1.5394E-15	T1	52.22
Error	99	1058.33	10.69			T2	52.92
Total	107	2499.07	23.36			T3	60.14

Elaborado por: Los autores, 2023.

En la Tabla 17, se presenta un análisis detallado de los promedios de humedad registrados en los diferentes tratamientos. Los resultados muestran que el tratamiento T1 exhibe un promedio de humedad del 52.22%, seguido de cerca por el T2 con un valor promedio de 52.92%, y finalmente el T3 con un promedio de 60.14%.

Es importante destacar que los niveles de humedad registrados se encuentran dentro de los rangos óptimos para llevar a cabo procesos de biorremediación. Teniendo en cuenta que las condiciones ideales para el desarrollo bacteriano en procesos de biorremediación se sitúan generalmente entre el 30% y el 90% de humedad de campo. Este rango es crucial, ya que la humedad desempeña un papel fundamental en el metabolismo bacteriano y ejerce una influencia significativa en el crecimiento y la actividad de los microorganismos.

12.8.3 Conductividad eléctrica de la muestra contaminada con hidrocarburo

En siguiente tabla se describe el análisis de la conductividad eléctrica de la muestra contaminada con hidrocarburo.

Tabla 18

Análisis de ANOVA y Tukey al 5% de la conductividad eléctrica de la muestra.

Análisis de Varianza (ANOVA)						Tukey (5 %)	
F. V	GL	SS	CM	F	P- valor	Tratamientos	Media
Tratamientos	8	3.93	0.49	2.968	0.005	T1	6.75
Error	99	16.40	0.17	2.968		T2	6.37
Total	107	20.33	0.19			T3	6.37

Elaborado por: Los autores, 2023.

En la tabla 18, se presenta un análisis de los tratamientos en relación a la variable de Conductividad Eléctrica (C.E.). La C.E. es una medida importante de la salinidad del suelo, y su valor puede verse influenciado por diversos factores, incluyendo la presencia de hidrocarburos en el suelo.

En este contexto, los resultados muestran que los tratamientos T1, T2 y T3 han sido evaluados en función de su C.E. El tratamiento T1 exhibe la mayor C.E. con un valor de 6.75 dS/m, lo que sugiere una mayor concentración de compuestos salinos en el suelo. Le siguen los tratamientos T2 y T3, ambos con valores de 6.37 dS/m.

Estos valores de C.E. son indicativos de la influencia de los hidrocarburos en la salinidad del suelo. Se sabe que los hidrocarburos pueden introducir una variedad de compuestos salinos en el suelo, algunos de los cuales se disuelven en el agua presente, mientras que otros pueden existir en forma de cristales muy finos. Estos compuestos salinos alteran la composición natural del suelo y contribuyen al aumento de la C.E.

12.8.4 Temperatura de la muestra contaminada con hidrocarburo

En siguiente tabla se describe el análisis de la temperatura de la muestra contaminada con hidrocarburo.

Tabla 19

Análisis de ANOVA y Tukey al 5% de la temperatura de la muestra.

Análisis de Varianza (ANOVA)						Tukey (5 %)	
F. V	GL	SS	CM	F	P- valor	Tratamientos	Media
Tratamientos	8	7.91	0.99	12.63	2.3678E-12	T1	19
Error	99	7.75	0.08			T2	19
Total	107	15.66	0.15			T3	19

Elaborado por: Los autores, 2023.

En la Tabla 19, se muestra la media de los valores de temperatura para los tres tratamientos. En cada caso, se obtuvo un valor de 19°C, lo que sugiere que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Esto puede atribuirse al hecho de que todos los tratamientos fueron llevados a cabo bajo condiciones ambientales idénticas durante la investigación.

13 Discusión

Analizando estos resultados se ve que el género más abundante fue *Serratia Sp.*, presente con un 39% de las muestras. *Serratia sp.* es una bacteria Gram negativa, bacilo y anaerobio facultativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* (Huicochea Montes,

2021). Estas cepas bacterianas tienen la notable habilidad de prosperar en la presencia de varios compuestos xenobióticos, incluyendo petróleo y metales pesados (Llanco Palomino & Reategui Del Aguila, 2020).

Las cepas bacterianas que tienen la capacidad de metabolizar xenobióticos, como el petróleo, también pueden desarrollar resistencia a uno o más antibióticos (Lozano Mahecha & López López, 2022), lo que las convierte en portadoras de genes de resistencia a antibióticos (Alonso Marques, 2022). La literatura científica ha reportado correlaciones entre la habilidad de cepas de *Serratia sp*, *Citrobacter sp*, *Proteus* y *Klebsiella*, siendo los patógenos oportunistas más frecuentemente identificados; además, se caracterizan por resistir la presencia de metales pesados, biocidas y por su capacidad de ser resistentes a múltiples antibióticos al mismo tiempo (More Calero, 2019).

En el análisis de las muestras de suelo contaminado con petróleo, se detectó la presencia de *Shigella* en el 17% de los casos. Es importante destacar que *Shigella* no es conocida por ser una bacteria degradadora de petróleo (Puga Barajas, 2019). En lugar de eso, *Shigella* es un género de bacterias Gram negativas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, y su principal característica es su capacidad para causar enfermedades gastrointestinales en humanos, como la shigelosis o disentería bacilar (Cerón López, 2023).

A pesar de no ser degradadora de petróleo, algunas cepas de *Shigella* han demostrado una cierta tolerancia a hidrocarburos o sus derivados como parte de su metabolismo (Castañeda Chávez, López Sánchez, Reyes Velázquez, Lango Reynoso, & Lizardi Jiménez, 2022). Sin embargo, es importante enfatizar que esta tolerancia a los hidrocarburos no implica que *Shigella* participe activamente en la degradación del petróleo, ya que esta capacidad es más característica de bacterias especializadas en la degradación de hidrocarburos.

En el análisis de las muestras, se encontró que tanto *Yersinia sp*, como *Hafnia* estaban presentes en el 11% cada una. *Hafnia*, un género de bacterias Gram negativas de la familia Enterobacteriaceae, es comúnmente hallada en el medio ambiente, como en el suelo y el agua, y también puede encontrarse en el tracto gastrointestinal de humanos y animales (González Romero, Cordovéz Martínez, & Cazares Silva, 2019). Sin embargo, *Hafnia* no es ampliamente conocida por tener propiedades de degradación de petróleo o hidrocarburos, lo que significa que no es una bacteria petrolífera especializada en la descomposición de componentes del petróleo crudo (Ramos Vivas, 2022).

Por otro lado, *Yersinia sp*, otro género de bacterias Gram negativas, es principalmente reconocida como una bacteria patógena que puede causar infecciones gastrointestinales en humanos y algunos animales (Ortega García, 2021). Aunque *Yersinia sp* es tolerante a los

hidrocarburos, no tiene la capacidad de degradarlos, lo que la diferencia de las bacterias petrolíferas especializadas que sí pueden utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono y energía (Bustamante Velarde, 2022).

Esto quiere decir que mientras *Hafnia* es una bacteria común en el medio ambiente y en el tracto gastrointestinal, no se conoce por degradar hidrocarburos. *Yersinia sp*, por otro lado, puede tolerar hidrocarburos, pero no es una bacteria degradadora de estos.

Enterobacter, una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, se encuentra frecuentemente en el medio ambiente, incluyendo el suelo, el agua y el tracto gastrointestinal de humanos y animales (González Romero, Cordovéz Martínez, & Cazares Silva, 2019). Se ha reportado que *E. aerogenes*, una de las especies representativas del género encontrado, tiene la capacidad de degradar el petróleo presente en suelos contaminados en un porcentaje cercano al 86% en un lapso de 28 días. Esto significa que esta bacteria muestra una alta eficacia en la descomposición de los compuestos petrolíferos en condiciones ambientales específicas (Argandoña Diaz & Siguenza Carlos, 2020).

Es importante destacar que la capacidad de degradar hidrocarburos puede variar entre diferentes cepas y ambientes, y el proceso de biorremediación mediante bacterias como *Enterobacter sp*, es un área de investigación importante para mitigar el impacto de la contaminación por petróleo en el medio ambiente.

Según un estudio realizado por (Castañeda-Chávez, López Sánchez, Reyes Velázquez, Lango Reynoso, & Lizardi Jiménez, 2022), menciona que la familia Enterobacteriaceae exhibe la capacidad de degradar y disminuir la presencia de hidrocarburos. Estos miembros, pertenecientes al grupo de bacterias gramnegativas, presentan aptitudes metabólicas para descomponer compuestos hidrocarbonados, lo que resulta en una disminución de la cantidad de TPHs (Total de Hidrocarburos Petrolíferos) en entornos contaminados. Algunos géneros específicos dentro de la familia Enterobacteriaceae podrían desempeñar un rol especialmente influyente en el proceso de degradación de hidrocarburos, lo que contribuye a acelerar el proceso de descomposición y, en consecuencia, a la disminución de la concentración de TPHs.

Según las directrices del Acuerdo Ministerial 097A (2015), los valores admisibles para terrenos de uso industrial son menores a 4000 mg/kg de TPH y menores a 1,5 mg/kg de HAPs (con una tolerancia cercana a cero o con perturbación insignificante). Los resultados alcanzados por los tratamientos T1, T2 y T3 al concluir el estudio confirman que el proceso de biorremediación de hidrocarburos no se ajusta a los límites establecidos por las regulaciones. Sin embargo, es relevante destacar que el tratamiento T3 demostró ser uno de

los más eficaces al degradar un 77 % de TPHs, por ende, se sugiere prolongar el tiempo para el desarrollo de las bacterias.

En estudios realizado por Novoa (2022), menciona que la familia Enterobacteriaceae demuestra la capacidad de degradar y reducir los hidrocarburos. Sus miembros, que son bacterias gramnegativas, exhiben habilidades metabólicas para descomponer compuestos hidrocarbonados, contribuyendo así a la reducción de la concentración de TPHs (Total de Hidrocarburos Petrolíferos) en un entorno contaminado. Algunos géneros específicos dentro de la familia Enterobacteriaceae pueden tener un papel más destacado en la degradación de hidrocarburos, contribuyendo a la aceleración del proceso de descomposición y, por lo tanto, a la reducción de la concentración de TPHs.

14 IMPACTOS

14.1 Técnico:

La investigación y el desarrollo de técnicas de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a nivel de laboratorio ayudan a comprender los mecanismos de degradación de los microorganismos nativos y a optimizar las condiciones para maximizar la eficiencia de la biorremediación.

14.2 Social:

La biorremediación de suelos contaminados puede mejorar la calidad del suelo y reducir la exposición humana a sustancias tóxicas presentes en los hidrocarburos. Esto puede tener un impacto positivo en la salud de las personas que viven o trabajan cerca de las áreas contaminadas.

14.3 Ambiental:

La biorremediación de suelos contaminados puede contribuir a la restauración de los ecosistemas afectados por la contaminación por hidrocarburos. Al permitir la degradación de los contaminantes, se facilita la recuperación de la biodiversidad, se previene que el suelo se siga contaminado y llegar a fuentes hídricas.

14.4 Económico:

La biorremediación puede ser una opción más rentable en comparación con otras técnicas de remediación de suelos contaminados, ya que implica menos costos de infraestructura y uso de materiales.

15 CONCLUSIONES

- A partir de tres muestras con 2 duplicados cada una, se obtuvieron un total de 18 colonias bacterianas. Mediante la técnica de tinción Gram, estas colonias se clasificaron en bacilos Gram negativos. Al identificar los bacilos Gram negativos como parte de la familia de las enterobacterias, se procedió a realizar pruebas bioquímicas para caracterizar cada especie identificada y determinar su género.
- El proceso de crio preservación de las bacterias se llevó a una temperatura de -20°C , demostrado ser una técnica altamente eficaz para la preservación a largo plazo de cepas bacterianas, garantizando la viabilidad y la capacidad funcional de estas bacterias, lo que es esencial para su uso en investigaciones futuras.
- El tratamiento 3 logró una notable eficacia al degradar un 77% de la contaminación presente en el suelo. Estos hallazgos demuestran la viabilidad y el potencial de las estrategias de remediación empleadas para mitigar los efectos negativos de la contaminación por hidrocarburos en el suelo. Sin embargo, es importante destacar que, aunque el tratamiento 3 mostró resultados prometedores, es esencial continuar investigando y refinando las técnicas de remediación para optimizar aún más su efectividad y considerar su implementación a gran escala en escenarios similares de contaminación ambiental

16 RECOMENDACIONES

- Es importante mantener un registro detallado de las cepas criopreservadas, incluyendo información como su origen, características y condiciones de congelación, además, asegurarse de etiquetar correctamente los criotubos para facilitar la identificación y recuperación de cepas específicas cuando sea necesario.
- Se recomienda que en adelante se realicen estudios para determinar la especie de la bacteria *Enterobacter* que se aisló con el fin de determinar si es *Enterobacter aerogenes* y determinar su capacidad de degradación de suelos contaminados con hidrocarburos.
- Establecer condiciones similares del sitio de muestreo en el laboratorio para una biorremediación más efectiva lo cual ayudaría a potenciar el metabolismo de las bacterias.

17 BIBLIOGRAFÍAS

- Acevedo Rojas, N. (2023). *Diseño de una herramienta pedagógica para la enseñanza de la nomenclatura y propiedades de los hidrocarburos que contribuya al desarrollo del pensamiento creativo. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia].* Repositorio Institucional. Obtenido de <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/83864>
- Acuerdo Ministerial 097A. (2015). *Refórmese el Texto Unificado de Legislación Secundaria.* Quito: Ministerio del Ambiente.
- Almazán Castañeda, P. (2023). *Fitorremediación de Helianthus annuus L. de un suelo contaminado con un hidrocarburo de petróleo (gasolina), asistida con bacterias y hongos promotores del crecimiento vegetal. [Tesis Posgrado, Colegio de Postgraduados].* Repositorio Institucional. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10521/5116>
- Alonso Marques, I. (2022). Estudio de las resistencias a antibióticos carbapenémicos en muestras y aislados de vegetales procedentes de cultivo ecológico (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València). *Estudio de las resistencias a antibióticos carbapenémicos en muestras y aislados de vegetales procedentes de cultivo ecológico.* Repositorio Institucional UPV, Valencia. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10251/188496>
- Amador Cervantes, K. A. (2021). *Evaluación de la protección ambiental en el sistema jurídico mexicano: El manejo del agua en la zona costera. [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Baja California Sur].* Repositorio Institucional. Obtenido de <http://rep.uabcs.mx/handle/23080/406>
- Antúnez Sánchez, A. F., & Bruzón Viltres, C. J. (Diciembre de 2012). LOS CONFLICTOS AMBIENTALES EN CUBA, SOLUCIÓN DENTRO DEL DERECHO INTERNO. SU TRATAMIENTO TEÓRICO DOCTRINAL EN OTROS SISTEMAS DE DERECHO COMPARADO. *SciELO*(35), 48. doi:http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-24742012000200016
- Argandoña Diaz, M., & Siguenza Carlos, K. M. (2020). Técnicas de biorremediación de suelos contaminados con petróleo usando microorganismos (Tesis de ingeniería, Universidad Cesar Vallejo). *Técnicas de biorremediación de suelos contaminados con petróleo usando microorganismos.* Repositorio de la Universidad César Vallejo, Lima. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12692/56303>

- Asamblea Nacional del Ecuador. (2008). *Constitución de la República del Ecuador dada por la Asamblea Nacional de 2008*. Montecristi. Obtenido de https://www.oas.org/juridico/pdfs/mesicic4_ecu_const.pdf
- Berrios Moron, K. D. (2022). *Biorremediación de suelos contaminados con gasolina de 95 octanos utilizando estiércol caprino*. [Tesis de Ingeniería, Universidad Científica del Sur]. Repositorio Institucional. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12805/2578>
- Bustamante Velarde, A. (2022). *Biorremediación de suelos contaminados con aceite residual de talleres automotrices: Revisión sistemática, 2022*(Tesis de Ingeniería, Universidad Cesar Vallejo). *Biorremediación de suelos contaminados con aceite residual de talleres automotrices: Revisión sistemática, 2022*. Repositorio de la Universidad César Vallejo, Lima. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12692/104119>
- Cárdenas Rodríguez, A. (2021). *Planificación de las acciones básicas de respuestas en caso de incidentes, accidentes o estados de emergencias ambientales de la Universidad de la Costa*. [Tesis de Pregrado, Universidad de la Costa]. Repositorio Institucional. Obtenido de <https://hdl.handle.net/11323/8873>
- Castañeda Chávez, M., López Sánchez, B. Y., Reyes Velázquez, C., Lango Reynoso, F., & Lizardi Jiménez, M. (13 de Octubre de 2022). Identificación de especies dominantes en un consorcio microbiano eficiente en la degradación de diésel. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 38, pág. 15.
- Castañeda-Chávez, M. d., López Sánchez, B. Y., Reyes Velázquez, C., Lango Reynoso, F., & Lizardi Jiménez, M. A. (2022). Identificación de especies dominantes en un consorcio microbiano eficiente en la degradación de diésel. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 38(155–167), 1-15. doi:<https://doi.org/10.20937/RICA.54235>
- Catagña Niza, J. (2016). *EVALUACIÓN DE ESPECIES GRAMÍNEAS LOCALES PARA LA REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR METALES PESADOS EN LA EMPRESA TRIBOILGAS* [Tesis de Ingeniería, Universidad Técnica de Cotopaxi]. Biblioteca Institucional. doi:<http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/3562>
- Cerón López, J. (2023). Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella* spp y *Shigella* spp aisladas de materia fecal de cerdos y humanos en una región de Morelos(Tesis de licenciatura, Univerisidad Autónoma Del Estado de Morelos). *Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana de Salmonella spp y Shigella spp aisladas de materia fecal de cerdos y humanos en una región de Morelos*. Repositorio

de la Univerisidad Autónoma Del Estado de Morelos, Morelos. Obtenido de <http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/3285>

Chávez Atalaya, K., Aguilar García, R., Coloma Vásquez, L., Jara Zelaya, M., & Montoya Flores, J. (2021). *Controles de calidad y ambientales de los materiales durante la fase de abastecimiento de un proyecto de edificación. [Tesis de Ingeniería, Pontificia Universidad Católica del Perú]*. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://hdl.handle.net/20.500.12404/20436>

Cruz Perez, A., Cruz Mendez, S. C., & Cruz Mendez, J. A. (2020). *CONTAMINACION DEL AGUA POTABLE POR AGROQUIMICOS. [Universidad Mayor De San Simòn]*. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://hdl.handle.net/123456789/18647>

García, A. M. (2021). Evaluación de la eficacia de la biorremediación en un sitio contaminado con metales pesados. En A. M. García, *Revista Internacional de Medio Ambiente* (págs. 8(1), 45-54). *Revista Internacional de Medio Ambiente*.

González Romero, A. C., Cordovéz Martínez, M. d., & Cazares Silva, M. (2019). Bacterias patógenas para el hombre aisladas en productos agrícolas provenientes de la cuenca del Rio Guano.(Tesis Laboratorio Clínico e Histopatológico, Universidad Nacional Chimborazo). *Bacterias patógenas para el hombre aisladas en productos agrícolas provenientes de la cuenca del Rio Guano*. Repositorio Digital de la Universidad Nacional Chimborazo, Riobamba. Obtenido de <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/6222>

González, R. P. (2020). *Evaluación de la contaminación del suelo con hidrocarburos*. *Revista de Medio Ambiente*.

Guerra Yepes, L. M. (2019). *Avances en la remediación biológica del mercurio: hongos macroscópicos como potenciales agentes de biorremediación.[Trabajo de grado - Maestría, Univerisidad Nacional de Colombia]*. Repositorio instucional. Obtenido de <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/77625>

Gutiérrez García, M. (2022). *Revisión sobre la utilización de bioindicadores para analizar la calidad del aire en contextos urbanos. [Monografía, Universidad Nacional Abierta y a Distancia]*. Repositorio Institucional. Obtenido de <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/38777>

Huicochea Montes, G. (2021). Bacterias patogenas presentes en dos zonas del Rio Apatlaco, en el Estado de Morelos(Tesis de licenciatura, Univerisidad Autónoma Del Estado de Morelos). *Bacterias patogenas presentes en dos zonas del Rio Apatlaco, en el Estado*

de Morelos. Repositorio de la Universidad Autónoma Del Estado de Morelos, MORELOS. Obtenido de <http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/3256>

Ibáñez Espín, A. (2022). *Evaluación de la exposición laboral a contaminantes químicos en el proceso de fabricación de baterías ácido-plomo. [Tesis de Ingeniería, Universidad Politécnica de Cartagena]*. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10317/12000>

Ito Chalco, E. (2022). *Revisión sistemática de la biorremediación del cadmio, plomo, arsénico y mercurio en suelos contaminados por la minería artesanal. [Tesis de Ingeniería, Universidad César Vallejo]*. Repositorio Institucional. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12692/92135>

Llanco Palomino, R. L., & Reategui Del Aguila, B. I. (2020). Identificación de bacterias degradadoras de petróleo en ecosistema acuático de una actividad petrolera de Coronel Portillo-Ucayali, 2018. (Tesis Pregrado, Universidad Nacional de Ucayali). *Identificación de bacterias degradadoras de petróleo en ecosistema acuático de una actividad petrolera de Coronel Portillo-Ucayali, 2018*. Repositorio institucional de la Universidad Nacional de Ucayali, Pucallpa. Obtenido de <http://repositorio.unu.edu.pe/handle/UNU/4320>

Lopez Dinorin, R. (2020). *Estudio electroosmótico de la migración de hidrocarburos en suelos finos. [Tesis de Maestría, Tecnológico Nacional de México]*. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://200.188.131.162:8080/jspui/handle/123456789/385>

Lozano Mahecha, R. A., & López López, K. (Junio de 2022). Aislamiento y caracterización de bacterias endémicas colombianas con capacidad de degradar tolueno. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 24(1), 13. doi:<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v24n1.98613>

Machuca Manrique, E. G. (2021). *Tecnologías amigables con el ambiente para la recuperación de suelo urbano contaminado por hidrocarburos en un taller mecánico, Chilca. [Tesis de Ingeniería, Universidad Nacional del Centro del Perú]*. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://hdl.handle.net/20.500.12894/7229>

Manrique, M., & Guisella, E. (2021). *Tecnologías amigables con el ambiente para la recuperación de suelo urbano contaminado por hidrocarburos en un taller mecánico, Chilca*[Tesis de pregrado, Universidad Nacional del Centro del Perú]. *Tecnologías amigables con el ambiente para la recuperación de suelo urbano contaminado por hidrocarburos en un taller mecánico, Chilca*. Repositorio de la Universidad Nacional del Centro del Perú, Chilca. Obtenido de <http://hdl.handle.net/20.500.12894/7229>

- Marroquin Sanchez, G. (2007). *Formación de sedimentos durante el hidrotreamiento catalítico de crudo pesado [Tesis de Doctorado, Instituto Politécnico Nacional]*. Repositorio Institucional . Obtenido de <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/167>
- Martínez Prado, A., Pérez López, E., Pinto Espinoza, J., Gurrola Nevárez, B. A., & Osorio Rodríguez, A. (2011). Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *SciELO*, 27(3), 12. Obtenido de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992011000300009
- Mayorga Mayorga, H. (2017). *Riesgos ambientales por derrame de petróleo en el nororiente ecuatoriano: Tiempos de respuesta y zonas vulnerables. [Tesis de Ingeniería, Escuela Politécnica Nacional]*. Biblioteca Institucional. Obtenido de <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/17101/1/CD-7672.pdf>
- Mejía Guerra, P. (2022). *Valoración del uso combinado de mezclas de materiales orgánicos y biofertilización con microorganismos en cultivo sin suelo. [Tesis de Maestría Universidad de Almería]*. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10835/13796>
- Mendoza Lombana, S. (2022). *Validación de estrategias profilácticas en larvicultura del camarón Penaeus vannamei en la provincia de Santa Elena, Mar Bravo. [Universidad Estatal Península de Santa Elena]*. Repositorio Institucional. Obtenido de <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/8074>
- Ministerial, A. 097. (2015). *Anexo 2 del libro VI del texto unificado de legislación secundaria del ministerio del ambiente: Normas de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados” en Ministerio del Ambiente*. Quito. Obtenido de https://www.gob.ec/sites/default/files/regulations/2018-09/Documento_Registro-Oficial-No-387-04-noviembre-2015_0.pdf
- Ministerio del Ambiente. (2014). *Guía para muestreo de suelos*.
- Montenegro Hernández, K. M., & Larrea Paredes, H. S. (2022). *Comportamiento del ozono troposférico y sus factores condicionantes medidos en la estación de Guamaní. Pichincha. Ecuador entre los años 2006-2020. [Tesis de Ingeniería, Universidad Central del Ecuador]*. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/26716>
- More Calero, F. (2019). *Caracterización Genómica y proteómica de bacterias costeras nativas degradadoras de hidrocarburos de petróleo (TESIS DE MAESTRIA, Universidad Nacional de Tumbes)*. *Caracterización Genómica y proteómica de bacterias costeras*

- nativas degradadoras de hidrocarburos de petróleo.* Repositorio digital Untumbes, Tumbes. Obtenido de <http://repositorio.untumbes.edu.pe/handle/UNITUMBES/388>
- Niño Zárate, J. (2023). *Biorremediación en suelos contaminados por hidrocarburos de petróleo: retos y oportunidades para Colombia en el marco de los Objetivos de Desarrollo Sostenible. [Tesis de Pregrado, Universidad de los Andes Colombia].* Repositorio Institucional. Obtenido de <http://hdl.handle.net/1992/67609>
- Noriega Luna, B. (2022). Análisis de la diversidad microbiana en la zona geotérmica de Apaseo el Alto, Gto.[Tesis de posgrado,Universidad de Guanajuato.]. *Análisis de la diversidad microbiana en la zona geotérmica de Apaseo el Alto, Gto.* Repositorio de la Universidad de Guanajuato, Guanajuato. Obtenido de <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/7524>
- Novoa García, M. (2022). *Microorganismos como herramienta para minimizar el impacto ambiental por derrame de hidrocarburos. [Tesis de Pregrado, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales].* Repositorio Institucional. Obtenido de <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/4717>
- Novoa García, M. (2022). *Microorganismos como herramienta para minimizar el impacto ambiental por derrame de hidrocarburos. [Tesis de Pregrado, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales].* Repositorio Institucional. Obtenido de <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/4717>
- Núñez, A., & Dos Santos, M. (2020). *Catálogo Ficológico.* San lorenzo : CYANOPHYTAS. Obtenido de <https://www.facen.una.py/wp-content/uploads/2020/05/CyanoVERSION-FINAL-2020.pdf>
- Oficial, R. (2016). *Ley Orgánica de ordenamiento Territorial, uso y gestión de suelo.* Quito. Obtenido de <http://www.competencias.gob.ec/wp-content/uploads/2023/05/Ley-Org%C3%A1nica-de-Ordenamiento-Territorial-Us-y-Gesti%C3%B3n-de-Suelo-versi%C3%B3n-25-de-marzo-de-2022.pdf>
- Oquendo Contreras, J., & Arcila Arcila, J. D. (2022). *Efectos en la piel asociados a la contaminación del aire. [Universidad de Antioquia].* Repositorio Institucional, Colombia. Obtenido de <https://hdl.handle.net/10495/26157>
- Ortega García , A. V. (2021). Evaluación de la capacidad fagocítica de macrófagos porcinos tipificados frente al patógeno Escherichia coli.(Tesis de Medicina Veterinaria, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales). *Evaluación de la capacidad fagocítica de macrófagos porcinos tipificados frente al patógeno Escherichia coli.*

Repositorio Institucional UDCA, Bogota. Obtenido de <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/4351>

Pérez Pozo, M. (2018). *Evaluación de la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando pseudomonas fluorescens*. [Tesis de Ingeniería, Universidad Politécnica Salesiana]. Quito, Ecuador. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15446>

Picado Carballo, K. (2022). *Caracterización, recolección y disposición final de materiales flotantes residuales en las etapas de floculación y sedimentación en la planta potabilizadora de Tres Ríos*. [Tesis de Ingeniería, Universidad Técnica Nacional]. Repositorio Institucional. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.13077/667>

Pinzón Rodríguez, O. A. (2022). *Evaluación de intermediarios de la degradación electrocatalítica de hidrocarburos presentes en aguas residuales de la industria petroquímica, utilizando cromatografía de gases con espectrometría de masas*. [Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio Institucional. Obtenido de <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/82330>

Plaza Avellán, I. E., & Intriago Quintana, J. A. (2020). *Obtención de bacterias endófitas del tomatillo (lycopersicum pinpinelifolium l.) como promotoras de crecimiento vegetal*. [Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí]. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://repositorio.espam.edu.ec/handle/42000/1322>

Portilla Farfán, F., León AVECILLAS, J., & Ulloa Bermeo, K. (2022). *Cartilla de Educación Ambiental*. [Universidad Politécnica Salesiana]. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/23632>

Prado Loza, L. (2021). *Implementación del Programa de Interpretación ambiental en el Santuario de vida silvestre Cavernas del Repechón Parque Nacional Carrasco – Cochabamba*. [Tesis de pregrado, Universidad Mayor de San Andrés]. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/25484>

Puga Barajas, H. (2019). *Evaluación de la diversidad de microorganismos (microalgas y bacterias) y su relación con la presencia de nitratos y fosfatos en un ecosistema lótico (agua y sedimento)*(tesis de Maestría en Ciencia, Universidad Autónoma de Queretaro). *Evaluación de la diversidad de microorganismos (microalgas y bacterias) y su relación con la presencia de nitratos y fosfatos en un ecosistema lótico (agua y sedimento)*. Repositorio institucional de la Universidad Autónoma de Queretaro, Queretaro. Obtenido de <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/1441>

- Pulido Parra, H. D., & Argüello Daza, B. A. (2015). *El juzgamiento nacional e internacional de las empresas multinacionales por daños ambientales. [Monografía para optar el título de Abogado, Universidad La Gran Colombia]*. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://hdl.handle.net/11396/5099>
- Ramos Vivas, J. (25 de Febrero de 2022). Microbiología de *Hafnia alvei*. *Revista Internacional de Microbiología Alimentaria*, 38(1), págs. 1-6. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.02.001>
- REPÚBLICA DEL ECUADOR ASAMBLEA NACIONAL. (2016). *LEY ORGÁNICA DE ORDENAMIENTO TERRITORIAL, USO Y GESTIÓN DE SUELO*. Quito. Obtenido de <https://www.gobiernoelectronico.gob.ec/wp-content/uploads/2020/08/Ley-Organica-de-Ordenamiento-Territorial-Uso-y-Gestion-de-Suelo1.pdf>
- Ripe Jaime, L. (2019). *Estudio del fenómeno del Quorum Sensing en aislamientos bacterianos marinos identificados como Stappia indica. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia]*. Repositorio Institucional. Obtenido de <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/78508>
- Ritorè, E. (2021). *Desarrollo de tecnologías de recuperación de subsuelos contaminados por hidrocarburos derivados del petróleo. [Tesis de Doctorado, Universidad de Sevilla]*. Repositorio Institucional. Obtenido de <https://hdl.handle.net/11441/128277>
- Rodríguez Ocha, E. P. (2018). *BIORREMEDIACIÓN DE LOS SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS PROVENIENTES DE LA ESTACIÓN DE SECOYA UTILIZANDO UN CONSORCIO BACTERIANO AEROBIO A ESCALA DE LABORATORIO. [Tesis de Ingeniería, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]*. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/10468>
- Rodríguez Pulido, L. (2022). *Procedimientos de identificación de bacterias causantes de la mastitis en bovinos y pruebas de sensibilidad: pasantía en el laboratorio de ciencias básicas de la Universidad Antonio Nariño, Bogotá. [Universidad Antonio Nariño]*. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://repositorio.uan.edu.co/handle/123456789/7455>
- Rodríguez, P., & Arenas Roberto. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica.*, 16(2), 2. doi:<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO>

- Romero, E., Cobo, J., Pérez, K., & Polo, L. (2020). *PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y MANEJO DEL AUTOCLAVE*[informe, Universidad de sucre]. Quito. Obtenido de https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/60248448/Informe_4_MICROBIOLOGIA_-_PREPARACION_DE_MEDIOS_DE_CULTIVO_Y_MANEJO_DEL_AUTOCLAVE20190809-38390-3e00tt-libre.pdf?1565385193=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DInforme_4_MICROBIOLOGIA_PREPARACI
- Sánchez Riofrio, C. D. (2022). Identificación de microorganismos mediante la captura en dos terrazas agrícolas en el Campus Salache, Latacunga, Cotopaxi.[Tesis de pregrado, Universidad técnica de Cotopaxi]. *Identificación de microorganismos mediante la captura en dos terrazas agrícolas en el Campus Salache, Latacunga, Cotopaxi*. Repositorio Digital Universidad Técnica de Cotopaxi , Latacunga. Obtenido de <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/9604>
- Sánchez Salao, M. (2021). *Diseño de un filtro de aire para reducir dióxido de carbono emitido por vehículos automotores de gasolina. [Tesis de Ingeniería,Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]*. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/15320>
- Sánchez Sánchez, F. (2020). *Evaluación de las estrategias utilizadas por las industrias petroleras (Ecopetrol-Pacific Rubiales Energy) en la resolución de conflictos socioambientales. Estudio de caso del municipio de Granada – Meta periodo 2014-2018. [Tesis de Maestría]*. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. Obtenido de <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/3600>
- Santos, R. G. (2016). *Evaluación de la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. Revista de Medio Ambiente.
- Science Photo Library. (29 de abril de 2013). *Alamy Foto de stock (fotografía)*. Obtenido de Alamy: www.alamy.es
- Sencia Choquenaira, R. (2020). *Diseño de un biodigestor para el aprovechamiento de la materia orgánica generada por hogares de bajos recursos económicos que crían animales menores ubicados en la zona agrícola de la ciudad de Arequipa en el año 2020. [Tesis de Ingeniería]*. Repositorio Institucional, Arequipa. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12394/8679>
- Serrano Espinosa, B. A. (2020). *Medición de Hidrocarburos en Transferencia de Custodia en México. [Tesis de Ingeniería, Insituto Politécnica Nacional]*. Repositorio Institucional, México. Obtenido de <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/28763>

- Sierra Gómez, J. (2021). *Biorremediación por landfarming de suelos contaminados por hidrocarburos*. [Tesis de Ingeniería, Universidad Nacional Abierta y a Distancia]. Repositorio Institucional. Obtenido de <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/42658>
- Sossa López, L. (2019). *Diseño de protocolo de manejo seguro de sustancias químicas para el Centro de Diseño e Innovación Tecnológica Industrial, Sena Dosquebradas*. [Universidad Libre]. Repositorio Institucional. Obtenido de <https://hdl.handle.net/10901/20062>
- Tamayo Rivera, P. (2021). *Caracterización de los principales grupos de microorganismos en un suelo volcánico de la zona Andina del Ecuador*. [Tesis de Ingeniería, Universidad Central del Ecuador]. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/25162>
- Tamba Pineda, M. A. (2023). *ANÁLISIS DE LA CASCARILLA DE ARROZ (Oryza sativa) COMO BIOADSORBENTE DE LA CONCENTRACIÓN DE CONTAMINANTES DEL EFLUENTE DE UNA LUBRICADORA*. [Tesis de Ingeniería, Universidad Agraria del Ecuador]. Repositorio Institucional, Ecuador. Obtenido de <https://cia.uagraría.edu.ec/Archivos/TAMBA%20PINEDA%20MARCELO%20AARON.pdf>
- Tipantuña Chiluisa, N. (2020). *Cinética del crecimiento de microorganismos durante el proceso de fermentación de una bebida ancestral elaborada a partir de chonta (Bactris gasipaes)*. [Tesis de ingeniería, Universidad Técnica de Cotopaxi]. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/6705>
- Torres Mateu, N. (2023). *Técnicas para recuperación de aguas contaminadas por hidrocarburos*. [Universidad de América]. Repositorio Institucional. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.11839/9207>
- Ureño García, U. (2023). *Evaluación de la estimulación de lipasa de Ricinus Communis L. con surfactante y lombricomposta comercial en la remediación de un suelo contaminado con aceite residual automotriz*. [Tesis de Ingeniería, Instituto Politécnico Nacional]. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/31828>
- Velasco Cruz, L. A. (2019). *Análisis de la movilidad electroforética y distribución del tamaño de partícula de asfaltenos purificados Pol-Chuc y asfaltenos extraídos del petróleo ligero ABK-D*. [Tesis de Ingeniería, Instituto Politécnico Nacional]. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/26826>

- Vergaray Ruiz, V. (2022). Aplicación de la técnica del microcosmo para evaluar la capacidad de los lodos residuales como biorremediadores de suelos contaminados con hidrocarburos[Tesis de licenciatura, Universidad Privada Del Norte]. *Aplicación de la técnica del microcosmo para evaluar la capacidad de los lodos residuales como biorremediadores de suelos contaminados con hidrocarburos*. Repositorio institucional UPN, Lima. Obtenido de <https://hdl.handle.net/11537/31244>
- Vilchez Marin, M. (2019). *Análisis de las causas de contaminación mineralógica en los acuíferos de la costa del Perú: Morrope*. [Tesis de Ingeniería, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo]. Repositorio Institucional. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12893/4895>
- Villa Morales, L. (2019). *Aplicación de sistemas de biorremediación en residuos acuosos generados por estaciones de servicio: Caso Planta Senkata Y.P.F.B.* [Proyecto de Grado, Universidad Mayor de San Andrés]. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/32257>
- Villanueva Vergara, V. (2020). *Evaluación del pasivo ambiental por derrame de hidrocarburos en el Estado de Tabasco*. [Tesis de Ingeniería, Instituto Politécnico Nacional]. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/28562>
- Zimmermann, R. (2022). *Quemaduras químicas y carbonización: efectos sobre tatuajes y su incidencia en la identificación de cadáveres*. [Universidad Faosta]. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://redi.ufasta.edu.ar:8082/jspui/handle/123456789/683>

18 ANEXOS

Muestra de suelo**Anexo 1**

Muestra de suelo contaminado con hidrocarburos

**Preparación de medios de cultivo****Anexo 2**

Preparación del medio de cultivo tioglicolato

**Anexo 3**

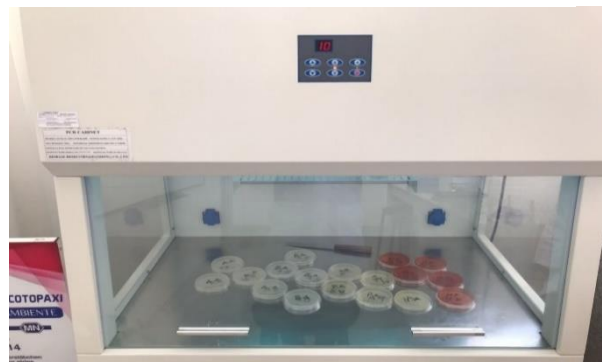
Autoclave de los medios de cultivo a 121 °C

**Anexo 4**

Medios Autoclavados

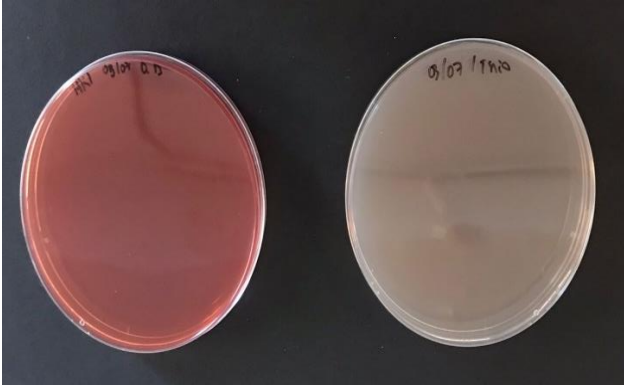
**Anexo 5**

Plaqueo de los medios preparados

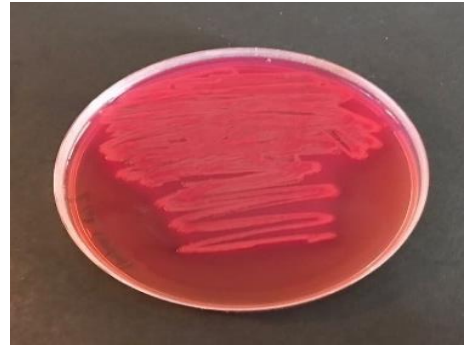
**Control de medios de cultivo**

Anexo 6

Medios sin inocular (control negativo)

**Anexo 7**

Agar MKL con inoculación de microorganismo Streptococcus sp. (Control positivo)

**Anexo 8**

Agar MKL con inoculación de microorganismo Streptococcus sp. (Control

**Diluciones seriadas****Anexo 9**

Muestras de suelo contaminado con hidrocarburos, disueltas en agua peptonada

**Anexo 10**

Homogenización de diluciones



Anexo 11

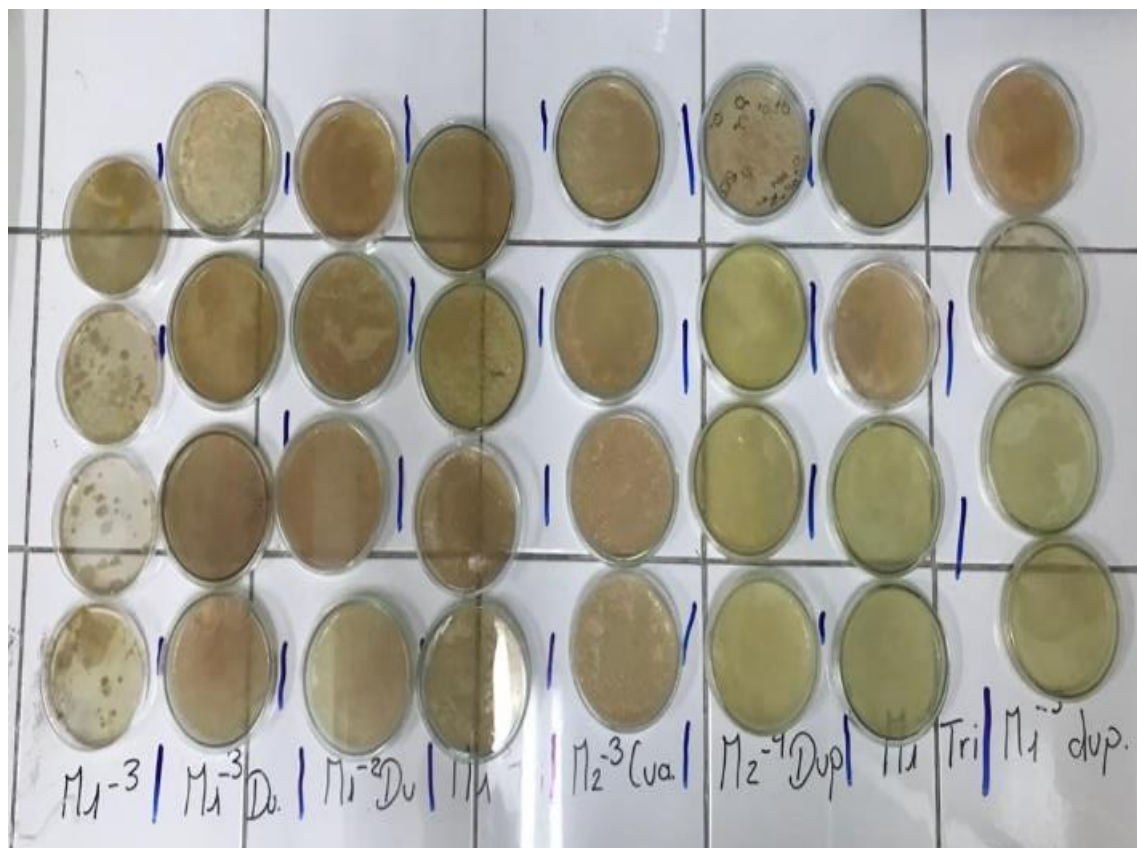
Dilución seriada de las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos

**Anexo 12**

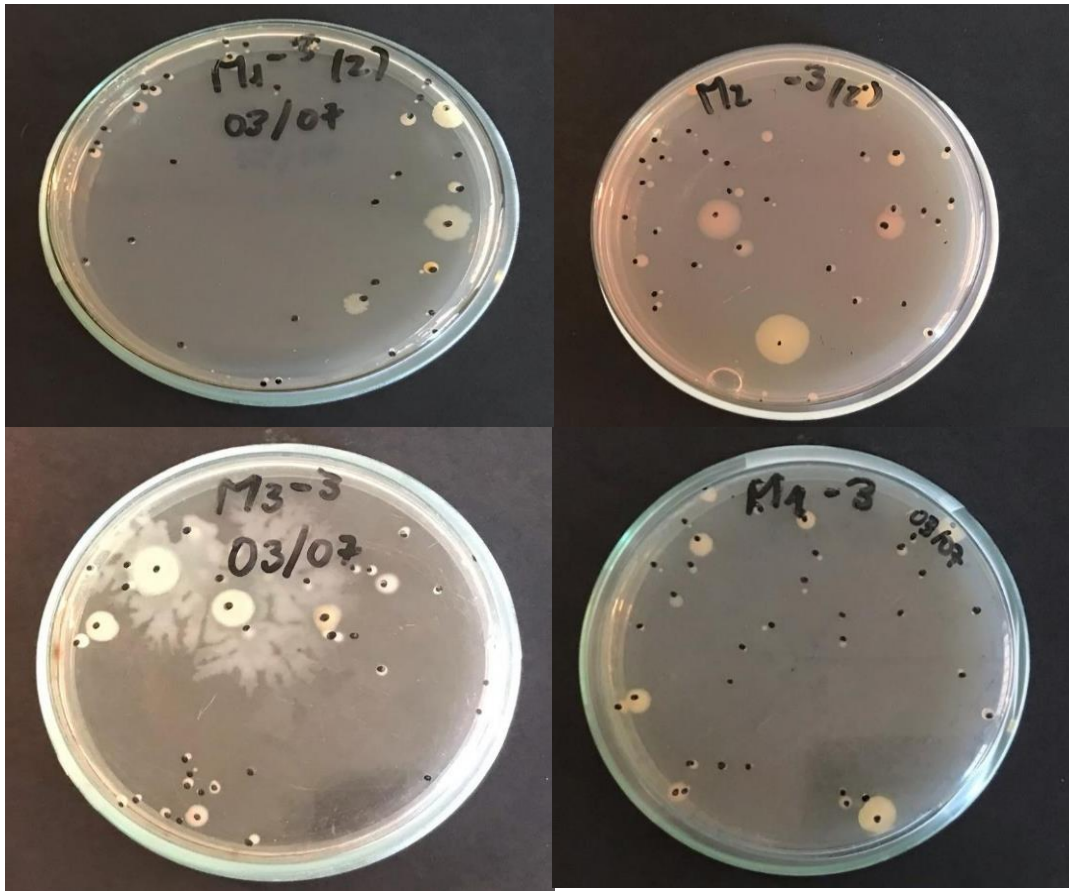
Siembra por método de barrida

**Anexo 13**

Diluciones seriadas en caja petri

**Cuantificación****Anexo 14**

Conteo de las bacterias de las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos



Caracterización macroscópica

Anexo 15

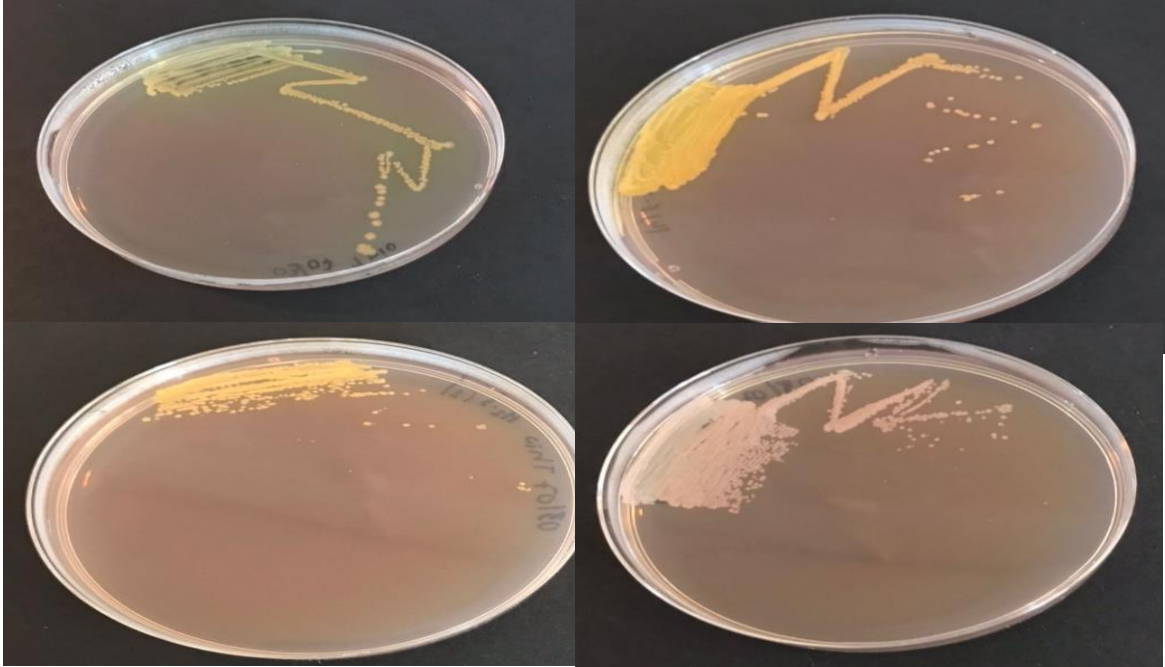
Caracterización microscópica de las Muestras



Aislamiento de bacterias

Anexo 16

Aislamiento de las bacterias más



Tinción de Gram

Anexo 17

Tinción de Gram, técnica ampliamente utilizada en microbiología para diferenciar y clasificar bacterias en función de sus características de



Pruebas bioquímicas

Anexo 18

MacConkey, medio de cultivo diferencial y selectivo para la familia de las *Enterobacteriaceae*

**Anexo 19**

Agar LIA

**Anexo 20**

Agar TSI

**Anexo 21**

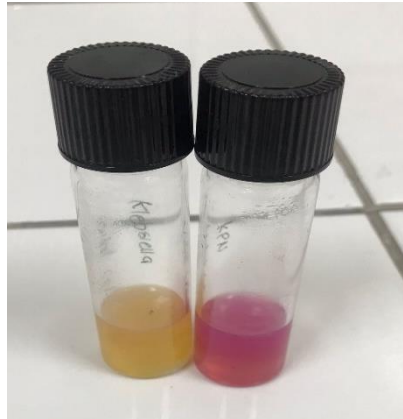
Agar MIO

**Anexo 22**

Agar CITRATO



Anexo 23
Agar UREA



Conservación de los aislados

Anexo 24
Conservación de los aislados



Tratamientos

Anexo 25
Tratamiento de suelo 1



Anexo 26

Tratamiento de suelo 2



Anexo 27

Tratamiento de suelo 3

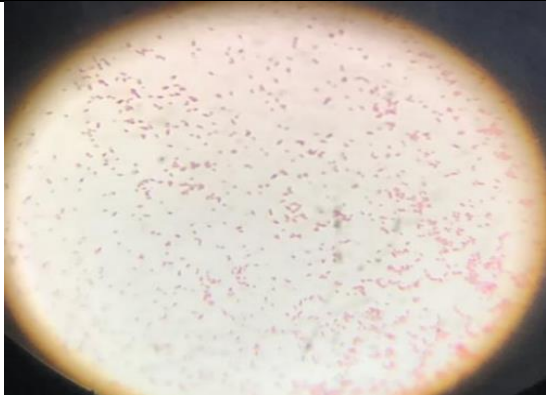
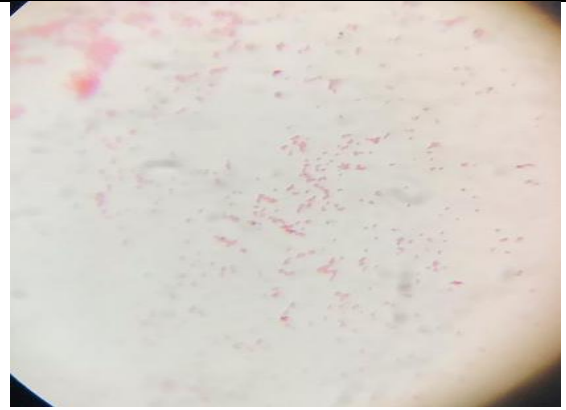
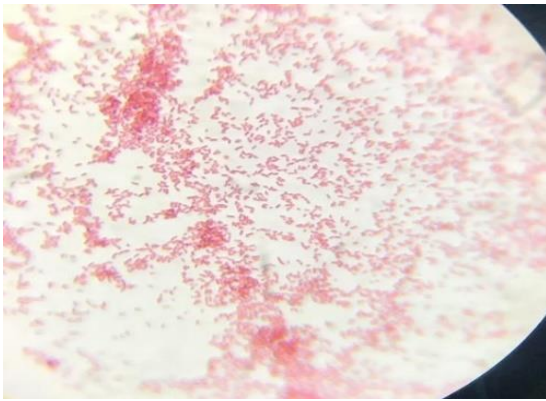
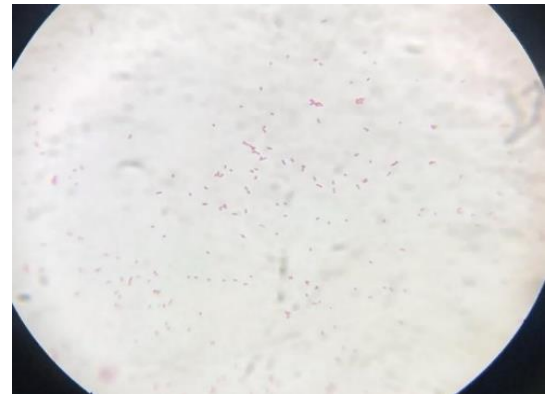
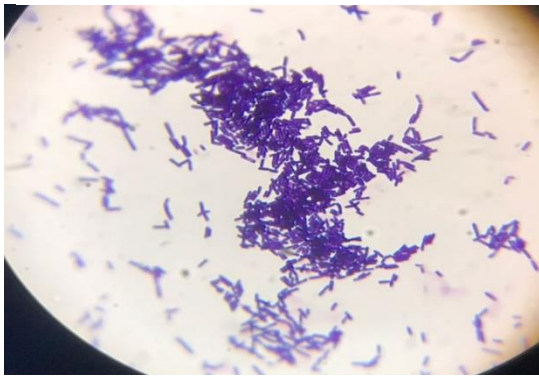


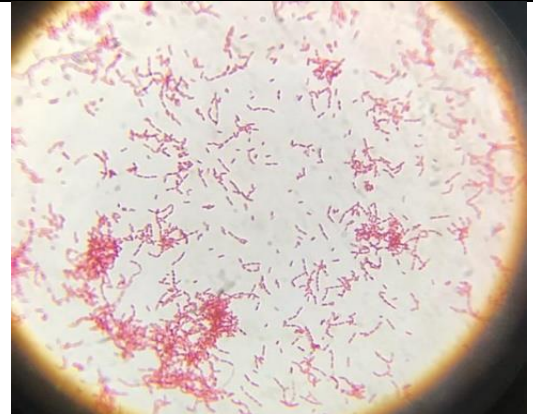
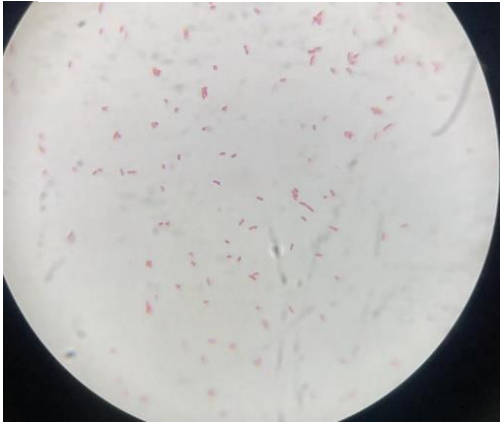
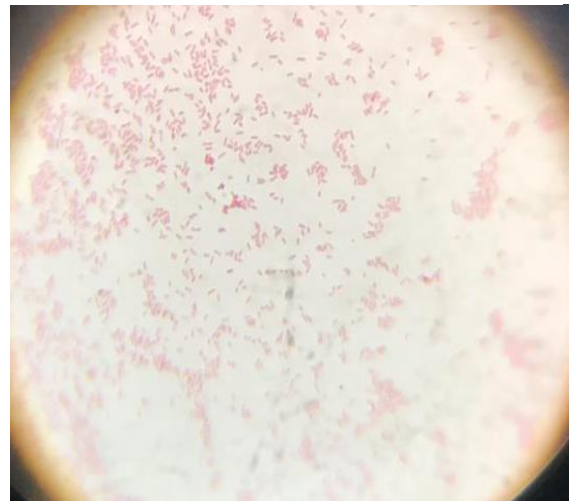
Anexo 28

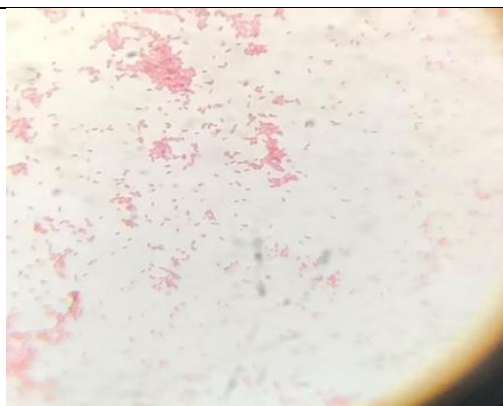
Cuantificación $M4^{-3}$ Tinción 1

Anexo 29

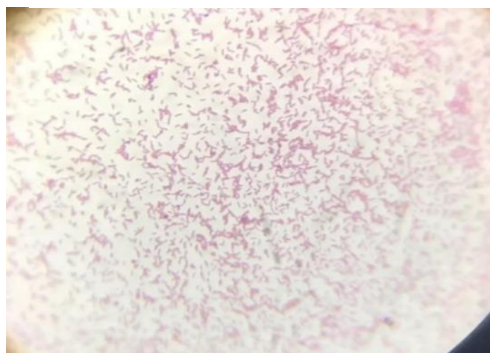
Cuantificación $M4^{-3}$ Tinción 2

**Anexo 30***Cuantificación $M4^{-3}$ Tinción 3***Anexo 31***Cuantificación $M4^{-3}$ Tinción 4***Anexo 32***Cuantificación $M4^{-3}$ Tinción 5***Anexo 33***Cuantificación $M4^{-3}$ Tinción 6***Anexo 34***Cuantificación $M4^{-3}$ Tinción 7***Anexo 35***Cuantificación $M4^{-3}$ Tinción 8*

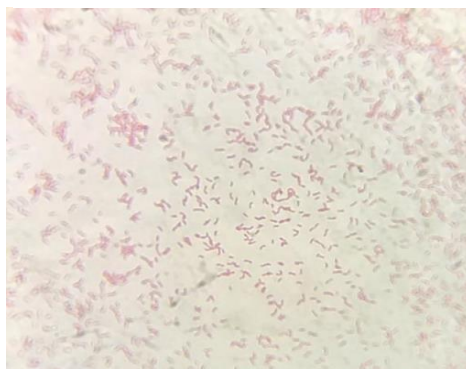
**Anexo 36***Cuantificación M4⁻³ Tinción 9***Anexo 37***Cuantificación M4⁻³ Tinción 10***Anexo 38***Cuantificación M2⁻³ Tinción 1***Anexo 39***Cuantificación M2⁻³ Tinción 2***Anexo 40***Cuantificación M2⁻³ Tinción 3***Anexo 41***Cuantificación M2⁻³ Tinción 4*

**Anexo 42**

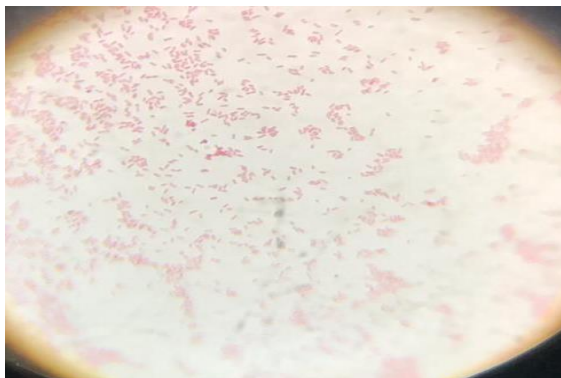
Cuantificación M2⁻³ Tinción 5

**Anexo 43**

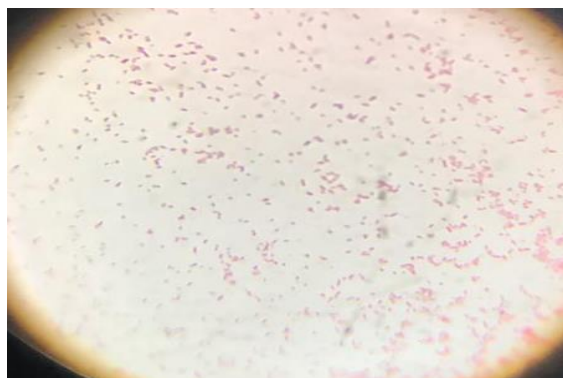
Cuantificación M2⁻³ Tinción 6

**Anexo 44**

Cuantificación M2⁻³ Tinción 7

**Anexo 45**

Cuantificación M2⁻³ Tinción 8



Elaborado por: Los autores, 2023.

Anexo 46

Tabla de criopreservación

Posillo	Codigo	Bacteria	Genero
1	(M4 10 ⁻³)1	Bacilos Gram negativos	<i>Enterobacter Sp</i>
2	(M4 10 ⁻³)1	Bacilos Gram negativos	<i>Enterobacter Sp</i>
3	(M4 10 ⁻³)1	Bacilos Gram negativos	<i>Enterobacter Sp</i>
4	(M4 10 ⁻³)2	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
5	(M4 10 ⁻³)2	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
6	(M4 10 ⁻³)2	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
7	(M4 10 ⁻³)3	Bacilos Gram negativos	<i>Yersinia Sp</i>
8	(M4 10 ⁻³)3	Bacilos Gram negativos	<i>Yersinia Sp</i>
9	(M4 10 ⁻³)3	Bacilos Gram negativos	<i>Yersinia Sp</i>
10	(M4 10 ⁻³)4	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
11	(M4 10 ⁻³)4	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
12	(M4 10 ⁻³)4	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
13	(M4 10 ⁻³)5	Bacilos Gram negativos	<i>Hafnia Sp</i>
14	(M4 10 ⁻³)5	Bacilos Gram negativos	<i>Hafnia Sp</i>
15	(M4 10 ⁻³)5	Bacilos Gram negativos	<i>Hafnia Sp</i>
16	(M4 10 ⁻³)6	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
17	(M4 10 ⁻³)6	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
18	(M4 10 ⁻³)6	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
19	(M4 10 ⁻³)7	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
20	(M4 10 ⁻³)7	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
21	(M4 10 ⁻³)7	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
22	(M4 10 ⁻³)8	Bacilos Gram negativos	<i>Citrobacter Sp</i>
23	(M4 10 ⁻³)8	Bacilos Gram negativos	<i>Citrobacter Sp</i>
24	(M4 10 ⁻³)8	Bacilos Gram negativos	<i>Citrobacter Sp</i>
25	(M4 10 ⁻³)9	Bacilos Gram negativos	<i>Hafnia Sp</i>
26	(M4 10 ⁻³)9	Bacilos Gram negativos	<i>Hafnia Sp</i>
27	(M4 10 ⁻³)9	Bacilos Gram negativos	<i>Hafnia Sp</i>
28	(M4 10 ⁻³)10	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
29	(M4 10 ⁻³)10	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
30	(M4 10 ⁻³)10	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
31	(M2 10 ⁻³) 1	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>

32	(M2 10 ⁻³) 1	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
33	(M2 10 ⁻³) 1	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
34	(M2 10 ⁻³) 2	Bacilos Gram negativos	<i>Shigella Sp</i>
35	(M2 10 ⁻³) 2	Bacilos Gram negativos	<i>Shigella Sp</i>
36	(M2 10 ⁻³) 2	Bacilos Gram negativos	<i>Shigella Sp</i>
37	(M2 10 ⁻³) 3	Bacilos Gram negativos	<i>Proteus Sp</i>
38	(M2 10 ⁻³) 3	Bacilos Gram negativos	<i>Proteus Sp</i>
39	(M2 10 ⁻³) 3	Bacilos Gram negativos	<i>Proteus Sp</i>
40	(M2 10 ⁻³) 4	Bacilos Gram negativos	<i>Klebsiella Sp</i>
41	(M2 10 ⁻³) 4	Bacilos Gram negativos	<i>Klebsiella Sp</i>
42	(M2 10 ⁻³) 4	Bacilos Gram negativos	<i>Klebsiella Sp</i>
43	(M2 10 ⁻³) 5	Bacilos Gram negativos	<i>Shigella Sp</i>
44	(M2 10 ⁻³) 5	Bacilos Gram negativos	<i>Shigella Sp</i>
45	(M2 10 ⁻³) 5	Bacilos Gram negativos	<i>Shigella Sp</i>
46	(M2 10 ⁻³) 6	Bacilos Gram negativos	<i>Shigella Sp</i>
47	(M2 10 ⁻³) 6	Bacilos Gram negativos	<i>Shigella Sp</i>
48	(M2 10 ⁻³) 6	Bacilos Gram negativos	<i>Shigella Sp</i>
49	(M2 10 ⁻³) 8	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
50	(M2 10 ⁻³) 8	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
51	(M2 10 ⁻³) 8	Bacilos Gram negativos	<i>Serratia Sp</i>
52	(M2 10 ⁻³) 9	Bacilos Gram negativos	<i>Yersinia Sp</i>
53	(M2 10 ⁻³) 9	Bacilos Gram negativos	<i>Yersinia Sp</i>
54	(M2 10 ⁻³) 9	Bacilos Gram negativos	<i>Yersinia Sp</i>

Elaborado por: Los autores, 2023.

Anexo 47

Tabla de de pruebas bioquimicas

Muestra	Mio			Citrato	TSI					
	Crecimiento	Movilidad	Indol	Positivos / Negativos	Superficie / Profundidad					
						Lactosa	Glucosa	Sacarosa	Producción gas	H2S
(M4 10-3)1	Satisfactorio	+	-	+	A/A	+	+	+	-	-
(M4 10-3)2	Satisfactorio	+	-	+	K/K	-	+	+	-	-
(M4 10-3)3	Satisfactorio	-	-	-	K/K	-	+	+	-	-
(M4 10-3)4	Satisfactorio	+	-	+	K/K	-	+	+	+	-
(M4 10-3)5	Satisfactorio	+	-	-	A/K	-	+	-	-	-
(M4 10-3)6	Satisfactorio	+	-	+	K/K	-	+	+	-	-
(M4 10-3)7	Satisfactorio	+	-	-	K/K	-	+	+	-	-
(M4 10-3)8	Satisfactorio	+	-	-	A/A	+	+	-	-	+
(M4 10-3)9	Satisfactorio	+	-	-	A/A	+	+	-	-	-
(M4 10-3)10	Satisfactorio	+	-	-	A/K	-	+	+	-	-
(M2 10-3) 1	Satisfactorio	+	-	+	A/K	-	+	+	-	-
(M2 10-3) 2	Satisfactorio	-	+	-	K/K	-	+	-	-	-
(M2 10-3) 3	Satisfactorio	+	-	+	K/K	-	+	+	-	+
(M2 10-3) 4	Satisfactorio	-	-	+	K/A	+	+	-	-	-

(M2 10-3) 5	Satisfactorio	-	-	-	k/K	-	+	-	-	-
(M2 10-3) 6	Satisfactorio	-	+	-	K/K	-	+	-	-	-
(M2 10-3) 7	Satisfactorio	+	-	+	K/K	-	+	+	-	-
(M2 10-3) 8	Satisfactorio	-	-	-	A/A	+	+	+	+	-

LIA					Urea	Resultado
Color pico de flauta	Color base del tubo	Ennegrecimiento del medio (H ₂ S)	Lisina descarboxilasa	Formación de gas	Positivo/ Negativo	
Morado	Amarillo	-	+	-	-	<i>Enterobacter Sp</i>
Morado	Amarillo	-	+	-	+	<i>Serratia Sp</i>
Morado	Morado	-	-	-	+	<i>Yersinia Sp</i>
Morado	Amarillo	-	+	-	-	<i>Serratia Sp</i>
Morado	Amarillo	-	+	-	-	<i>Hafnia Sp</i>
Morado	Amarillo	-	+	-	-	<i>Serratia Sp</i>
Rojo	Amarillo	-	+	-	-	<i>Serratia Sp</i>
Rojo	Amarillo	-	+	-	+	<i>Citrobacter Sp</i>
Morado	Morado	-	-	-	-	<i>Hafnia Sp</i>
Morado	Amarillo	-	+	-	+	<i>Serratia Sp</i>
Morado	Amarillo	-	+	-	+	<i>Serratia Sp</i>
Morado	Morado	-	-	-	-	<i>Shigella Sp</i>

Morado	Morado	-	-	-	+	<i>Proteus Sp</i>
Morado	Amarillo	-	+	-	+	<i>Klebsiella Sp</i>
Morado	Morado	-	-	-	-	<i>Shigella Sp</i>
Morado	Morado	-	-	-	-	<i>Shigella Sp</i>
Morado	Amarillo	-	+	-	+	<i>Serratia Sp</i>
Morado	Morado	-	-	-	-	<i>Yersinia Sp</i>

Elaborado por: Los autores, 2023.

Anexo 48

Datos de pH del suelo

Fecha	T1			T2			T3		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
26/6/2023	8.19	8.19	8.18	8.21	8.2	8.19	8.19	8.18	8.19
28/6/2023	8.19	8.19	8.18	8.21	8.2	8.19	8.18	8.18	8.18
30/6/2023	8.18	8.17	8.17	8.2	8.19	8.18	8.18	8.18	8.18
3/7/2023	8.18	8.17	8.17	8.2	8.19	8.18	8.18	8.17	8.18
5/7/2023	8.17	8.16	8.17	8.2	8.19	8.18	8.17	8.17	8.17
7/7/2023	8.17	8.16	8.15	8.19	8.18	8.17	8.17	8.17	8.17
10/7/2023	8.15	8.15	8.14	8.19	8.18	8.17	8.16	8.17	8.17
12/7/2023	8.15	8.15	8.14	8.17	8.17	8.16	8.16	8.16	8.16
14/7/2023	8.15	8.14	8.14	8.17	8.16	8.16	8.15	8.16	8.15
17/7/2023	8.14	8.14	8.14	8.15	8.15	8.16	8.15	8.16	8.15
19/7/2023	8.14	8.14	8.14	8.15	8.14	8.15	8.14	8.15	8.14
21/7/2023	8.14	8.14	8.13	8.14	8.13	8.15	8.13	8.15	8.14
Promedio	8.16	8.16	8.15	8.18	8.17	8.17	8.16	8.17	8.17

Elaborado por: Los autores, 2023.

Anexo 49

Datos de humedad

Fecha	T1 (%)			T2 (%)			T3 (%)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
26/6/2023	55	55	55	55	55	55	65	65	65
28/6/2023	55	55	55	55	55	55	65	65	65
30/6/2023	50	55	55	55	55	55	65	65	65
3/7/2023	50	55	55	55	55	55	65	65	65
5/7/2023	50	55	55	55	55	55	65	60	65
7/7/2023	50	55	55	50	55	55	60	60	60
10/7/2023	50	50	55	50	55	55	60	60	60
12/7/2023	50	50	55	50	55	55	60	55	60
14/7/2023	50	50	50	50	50	50	55	55	55
17/7/2023	50	50	50	50	50	50	55	55	55
19/7/2023	50	50	50	50	50	50	55	55	55

21/7/2023	50	50	50	50	50	50	55	55	55
Promedio	50.83	52.50	53.33	52.08	53.33	53.33	60.42	59.58	60.42

Elaborado por: Los autores, 2023.

Anexo 50

Datos conductividad

Fecha	T1			T2			T3		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
28/7/2023	6.75	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8
30/7/2023	6.75	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8
3/8/2023	6.75	6.8	6.8	6.8	6.8	6.7	6.8	6.8	6.7
26/7/2023	6.75	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8
5/8/2023	6.74	6.8	6.8	6.7	6.8	6.7	6.7	6.8	6.7
7/8/2023	6.73	6.8	6.8	6.5	6.7	6.6	6.6	6.7	6.6
10/8/2023	6.73	6.8	6.8	6.4	6.5	6.4	6.4	6.5	6.4
12/8/2023	6.73	6.7	6.7	6.3	6.4	6.3	6.3	6.4	6.3
14/08/2023	6.73	6.7	6.7	6.3	6.3	5.8	6.3	6.3	5.8
17/08/2023	6.73	6.7	6.7	6.3	5.5	5.7	6.3	5.5	5.7
19/08/2023	6.73	6.7	6.7	6.1	5.4	5.5	6.1	5.4	5.5
21/08/2023	6.73	6.7	6.7	5.9	5.3	5.4	5.9	5.3	5.4
Promedio	6.74	6.74	6.74	6.47	6.34	6.30	6.49	6.35	6.30

Elaborado por: Los autores, 2023.

Anexo 51

Datos de temperatura

Fecha	T0(°C)			T1(°C)			T2(°C)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
28/7/2023	19	19	19	19	19	19	19	19	19
30/7/2023	19	19	19	19	19	19	19	18	19
3/8/2023	19	19	19	19	19	19	19	18	19
26/7/2023	19	19	19	19	18	19	19	19	19
05/8/2023	19	19	19	19	18	19	19	19	19
07/8/2023	19	18	19	19	18	19	19	19	19
10/8/2023	19	18	19	19	18	19	19	19	19
12/8/2023	19	18	19	19	18	19	19	19	19
14/08/2023	19	18	19	19	18	19	19	19	19

17/08/2023	19	18	19	19	18	19	19	19	19
19/08/2023	19	18	19	19	18	19	19	19	19
21/08/2023	19	18	19	19	18	19	19	19	18
Promedio	19.00	18.42	19.00	19.00	18.25	19.00	19.00	18.83	18.92

Elaborado por: Los autores, 2023.

Anexo 52

Resultados de THPs en peso seco del suelo tratamiento 1.



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
OFERTA DE SERVICIOS Y PRODUCTOS
ÁREA AMBIENTAL
INFORME DE RESULTADOS

INF.N°: 2023-0365-1-2

SOLICITADO POR ³ :	VALLADOLID MORENO WILBER BERNARDO		
DIRECCION DEL CLIENTE ³ :	PICHINCHA / QUITO/ LUCHA DE LOS POBRES		
MUESTRA DE ³ :	SUELO		
DESCRIPCIÓN ³ :	MUESTRA SUELO 1		
FECHA DE RECEPCIÓN:	21/7/2023	HORA DE RECEPCIÓN:	15H38
FECHA DE ANÁLISIS:	DEL 21/07/2023 AL 01/08/2023		
FECHA DE EMISIÓN DEL INFORME:	2/8/2023		
CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA			
CARACTERÍSTICA:	CAFÉ	ESTADO:	SOLIDO
		CONTENIDO:	100 g
OBDBERVACIONES:	* Los resultados que constan en el presente informe se refieren a la muestra entregada por el cliente al OSP.		

INFORME

PARAMETROS	UNIDADES	RESULTADOS	METODOS	INCERTIDUMBRE %
TPH INFRAROJO	mg/Kg	33026	M-GO-AM-62 MÉTODO INFRARROJO	-

3: DATOS PROPORCIONADOS POR EL CLIENTE Y DE SU RESPONSABILIDAD.



B.F. ALICIA CEPÁ
RESPONSABLE DEL AREA DE AMBIENTAL



Anexo 53

Resultados de THPs en peso seco del suelo tratamiento 2.



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
OFERTA DE SERVICIOS Y PRODUCTOS
ÁREA AMBIENTAL
INFORME DE RESULTADOS

INF.N°: 2023-0365-1-3

SOLICITADO POR ³ :	VALLADOLID MORENO WILBER BERNARDO		
DIRECCION DEL CLIENTE ³ :	PICHINCHA / QUITO/ LUCHA DE LOS POBRES		
MUESTRA DE ³ :	SUELO		
DESCRIPCIÓN ³ :	MUESTRA SUELO 2		
FECHA DE RECEPCIÓN:	21/7/2023	HORA DE RECEPCIÓN:	15H38
FECHA DE ANÁLISIS:	DEL 21/07/2023 AL 01/08/2023		
FECHA DE EMISIÓN DEL INFORME:	2/8/2023		
CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA			
CARACTERÍSTICA:	CAFÉ	ESTADO:	SOLIDO
		CONTENIDO:	100 g
OBDBERVACIONES:	* Los resultados que constan en el presente informe se refieren a la muestra entregada por el cliente al OSP.		

INFORME

PARAMETROS	UNIDADES	RESULTADOS	METODOS	INCERTIDUMBRE %
TPH INFRAROJO	mg/Kg	27500	M-GO-AM-62 MÉTODO INFRARROJO	-

3: DATOS PROPORCIONADOS POR EL CLIENTE Y DE SU RESPONSABILIDAD.



Firmado digitalmente por:
ALICIA BEATRIZ CEPA
LARA

B.F. ALICIA CEPA
RESPONSABLE DEL AREA DE AMBIENTAL



Anexo 54

Resultados de THPs en peso seco del suelo tratamiento 3.



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
OFERTA DE SERVICIOS Y PRODUCTOS
ÁREA AMBIENTAL
INFORME DE RESULTADOS

INF.N°: 2023-0365-1-1

SOLICITADO POR ³ :	VALLADOLID MORENO WILBER BERNARDO		
DIRECCION DEL CLIENTE ³ :	PICHINCHA / QUITO/ LUCHA DE LOS POBRES		
MUESTRA DE ³ :	SUELO		
DESCRIPCIÓN ³ :	MUESTRA SUELO 3		
FECHA DE RECEPCIÓN:	21/7/2023	HORA DE RECEPCIÓN:	15H38
FECHA DE ANALISIS:	DEL 21/07/2023 AL 01/08/2023		
FECHA DE EMISIÓN DEL INFORME:	2/8/2023		
CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA			
CARACTERÍSTICA:	CAFÉ	ESTADO:	SOLIDO
		CONTENIDO:	100 g
OBSEVACIONES:	* Los resultados que constan en el presente informe se refieren a la muestra entregada por el cliente al OSP.		

INFORME

PARAMETROS	UNIDADES	RESULTADOS	METODOS	INCERTIDUMBRE %
TPH INFRARROJO	mg/Kg	7484	M-GO-AM-62 MÉTODO INFRARROJO	-

3: DATOS PROPORCIONADOS POR EL CLIENTE Y DE SU RESPONSABILIDAD.



“Los ensayos marcados con (*) NO están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE”



Firmado digitalmente por:
ALICIA BEATRIZ CEPALARA



1 1/1

Dirección: Francisco Viteri s/n y Gilberto Gatto Sobral- Teléfonos: 2502-262 / 2502-456, ext. 15,18,21,31,33
Teléfono: 3216740 - E-mail: fcaj.osp@uce.edu.ec

R-GO-01-17

Anexo 55. Aval del Traductor



CENTRO
DE IDIOMAS

AVAL DE TRADUCCIÓN

En calidad de Docente del Idioma Inglés del Centro de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal **CERTIFICO** que:

La traducción del resumen al idioma Inglés del proyecto de investigación cuyo título versa: **“BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS A TRAVÉS DE MICROORGANISMOS NATIVOS A NIVEL DE LABORATORIO, PERIODO 2023”** presentado por: **Donoso Cáceres Dennis Steven y Valladolid Sánchez Jefferson Gabriel** egresados de la Carrera de: **Ingeniería Ambiental**, perteneciente a la **Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales**, lo realizaron bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del Idioma.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo a los peticionarios hacer uso del presente aval para los fines académicos legales.

Latacunga, Agosto del 2023.

Atentamente,



CENTRO
DE IDIOMAS

Mg. Marco Paúl Beltrán Semblantes

DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS-UTC

CC: 0502666514