

# UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA



## ESCUELA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

Tesis previa la obtención del Título de:

**INGENIERO AMBIENTAL**

**TEMA:**

“BIORREMEDIACIÓN MICROBIANA *IN VIVO* DE MUESTRAS DE SUELO  
CONTAMINADO DE FORMA ARTIFICIAL CON PETRÓLEO”

**AUTOR:**

CARLOS TOMAS VALENTE CEPEDA

**DIRECTORA:**

DRA. LAURA SCALVENZI

PASTAZA – ECUADOR

2016

## **PRESENTACIÓN DEL TEMA**

“BIORREMEDIACIÓN MICROBIANA *IN VIVO* DE MUESTRAS DE SUELO  
CONTAMINADO DE FORMA ARTIFICIAL CON PETRÓLEO”

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

---

M.Sc. Leo Rodríguez

---

M.Sc. Marco Heredia

---

Dr. Roldan Torres

## **CERTIFICADO DEL TUTOR**

En calidad de Directora de la tesis denominada “BIORREMEDIACIÓN MICROBIANA *IN VIVO* DE MUESTRAS DE SUELO CONTAMINADO DE FORMA ARTIFICIAL CON PETRÓLEO” del autor Carlos Tomas Valente Cepeda con cédula 1600234254, egresado de la carrera de Ingeniería Ambiental considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del jurado examinador designado por el Consejo Directivo.

---

Dra. Laura Scalvenzi

## **AUTORÍA DEL TRABAJO**

Yo Carlos Tomas Valente Cepeda de nacionalidad ecuatoriano con C.C. 1600234254 declaro bajo juramento que el trabajo de tesis aquí escrito y todo su contenido son de mi autoría; y no ha sido presentado para ningún tipo de grado o calificación profesional; todas las referencias bibliográficas que se incluyeron en este documento han sido consultadas bajo mi responsabilidad.

La Universidad estatal Amazónica puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo según lo establecido por la ley de propiedad intelectual, por su reglamento que por la normatividad de institución vigente.

---

Carlos Tomas Valente Cepeda

## **APROBACIÓN DEL JURADO CALIFICADOR**

Los miembros del tribunal aprobaron el informe de investigación sobre el tema  
“BIORREMEDIACIÓN MICROBIANA *IN VIVO* DE MUESTRAS DE SUELO  
CONTAMINADO DE FORMA ARTIFICIAL CON PETRÓLEO”  
MIEMBROS DEL TRIBUNAL

---

M.Sc. Leo Rodríguez

---

M.Sc. Marco Heredia

---

Dr. Roldan Torres

## **AGRADECIMIENTOS**

La realización de la tesis de pregrado de Ingeniería Ambiental ha sido una experiencia importante en el transcurso de mi profesión, en la cual he relacionado y adquirido conocimientos de parte de personas de mucho valor, que directa o indirectamente han participado en este trabajo realizado. Por lo tanto debo extender mi sincero agradecimiento a las personas de buen corazón que me han ayudado.

En primer lugar a la Dra. Laura Scalvenzi, como directora de esta tesis, que ha estado permanentemente del inicio de este proyecto, indicando los procedimientos a seguir en la redacción y en la ejecución del estudio. Me ha guiado con perseverancia y rigor, con el objetivo de concretar esta investigación.

También debo agradecer en especial al Dr. Naja Raju Maddela investigador Prometeo, cotutor de esta tesis, por haber compartido sus conocimientos, en la fase laboratorio y en el campo.

Agradezco al Dr. Carlos Bravo, por haber confirmado y rectificado los datos obtenidos del análisis físico-químico de las muestras de suelo.

A la Ing. Andrea Tapuy, responsable del laboratorio de química, por haber indicado con paciencia todo los pasos a seguir en el procedimiento de los análisis físico-químicos.

A la Ing. Andrea Riofrío, responsable del laboratorio de biología, por facilitar los materiales, herramientas y reactivos para proceder a realizar el cultivo de microorganismos degradantes de HTP seleccionados.

A la Ing. Deysi Changoluisa, responsable del laboratorio de suelos, por demostrar y realizar las técnicas del análisis físico-químico del suelo, durante el proceso experimental.

A la Ing. Derwin Viafara, responsable del laboratorio de bromatología, por facilitar los reactivos y equipos.

También han habido personas fuera del establecimiento, mi familia, madre, padre, hermana y en especial mi hermano Fernando, que me han colaborado de alguna manera, para culminar esta investigación de tesis.

## **DEDICATORIA**

Esta tesis la dedico al creador divino Dios quién supo guiarme y cuidarme por el buen camino, dándome las fuerzas necesarias para seguir adelante y no desvanecerme en los momentos más difíciles que se presentaban, con virtud de paciencia y tolerancia infinita de intentar de culminar esta meta.

A mi familia quienes por ellos he culminado mi estudio

Para mis padres por su apoyo profundo, animo, comprensión, amor, ayuda en los momentos más difíciles, y por ayudarme con los recursos económicos para estudiar. Me han direccionado como una persona leal, mis valores, mis principios, mi carácter, mi desempeño, mi perseverancia, mi coraje para cumplir y conseguir mis objetivos propuestos.

A la familia universitaria quien supo compartir sus conocimientos.

A todos los docentes y compañeros estudiantes de la Universidad Estatal Amazónica, los cuales me han permitido ser parte fundamental de la familia universitaria para así llegar a la meta final mi profundo agradecimiento.



## INDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
Objetivos .....	3
1.1 Objetivo general .....	3
1.2 Objetivos específicos.....	3
1.3 Hipótesis general .....	3
2. REVISION DE LITERATURA .....	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	7
3.1 Localización y duración del experimento.....	7
3.2 Condiciones meteorológicas.....	7
3.3 Materiales y equipos.....	7
3.4 Diseño experimental.....	8
3.5 Variables a evaluar .....	12
3.6 Manejo del experimento.....	12
3.6.1 Preparación de los cajones.....	12
3.6.2 Elaboración del inóculo microbiano .....	13
3.6.3 Elaboración del portador granulado de maíz .....	14
3.6.4 Preparación de los tratamientos y el testigo en el campo .....	16
3.6.5 Extracción y análisis de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) por cromatografía de gas .....	18
3.6.6 Análisis físico-químico del suelo.....	19
3.6.7 Análisis microbiológico del suelo.....	21
3.6.8 Análisis estadístico .....	23
4.1 Cromatografía de gases de los TPH del suelo.....	23
4.2 Efecto de los nutrientes (bioestimulación) en la biodegradación de TPH, microorganismos nativos.....	26
4.3 Capacidad biodegradadora de TPH de microorganismos nativos .....	31

4.4 Análisis físico-químico de suelos de los tratamientos.....	34
5. CONCLUSIONES .....	38
6. RECOMENDACIONES .....	39
7. RESUMEN.....	40
8. ABSTRACT .....	41
9. BIBLIOGRAFIA .....	42

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 .Características y siglas del testigo y los tratamientos investigados. ....	11
Tabla 2. – TPH residuales y porcentaje de degradación de TPH después de 90 días, en los diferentes tratamientos .....	24
Tabla 3. Estadística aritmética .....	24
Tabla 4. Comparación de la degradación de TPH entre los tratamientos con y sin nutrientes, y proporción de incremento de degradación .....	31
Tabla 5. Características físico-químicas del suelo de los tratamientos “An”, “Ev” y “En” .....	35
Tabla 6. Características físico-químicas del suelo de los tratamientos de bioaumentación y bioestimulación.....	36
Tabla 7. Características físico-químicas del suelo de los tratamientos de bioaumentación .....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes al microscopio de las bacterias (a) <i>Bacillus cereus</i> , (b) <i>Bacillus thuringiensis</i> y de los hongos (c) <i>Geomyces pannorum</i> y (d) <i>Geomyces</i> sp. (Maddela <i>et al.</i> , 2016) .....	13
Figura 2. Hongos <i>Geomyces pannorum</i> y <i>Geomyces</i> sp. en cajas Petri con medio de cultivo PDA (Maddela <i>et al.</i> , 2016) .....	14
Figura 3. Esquema de las diluciones cuantitativas para determinar la cantidad (UFC g suelo <sup>-1</sup> ) de microorganismos degradantes de HTP en una muestra de suelo. ....	22
Figura 4. Gas-cromatogramas de los TPH residuales en el suelo después de 90 días, en los siguientes tratamientos: (a) Atenuación natural; (b) Evaporación; (c) Estimulación natural.....	26
Figura 5. Gas-cromatogramas de los TPH residuales en el suelo después de 90 días, en los tratamientos con Bioaumentación y Bioestimulación. (a) Atenuación natural; (b) Ba-Be-BH; (c) Ba-Be-B; (d) Ba-Be-H.....	27
Figura 6. Gas-cromatogramas de los residuos de HTP en el suelo después de 90 días, en los tratamientos con Bioaumentación. (a) Atenuación natural; (b) Ba-BH; (c) Ba-B; (d) Ba-H .....	29
Figura 7. Concentración de bacterias y hongos nativos degradantes de TPH ( $\times 10^5$ UFCg <sup>-1</sup> y UFC/g <sup>-1</sup> ) en el suelo natural, al tiempo cero (control). ....	32
Figura 8. Concentración de bacterias degradantes TPH ( $\times 10^5$ UFCg <sup>-1</sup> ) y hongos degradantes TPH ( $\times 10^5$ UFCg <sup>-1</sup> ), al tiempo 0 y después de 90 días, en los tratamientos: Atenuación natural (An), Evaporación (Ev), Estimulación natural (En).....	32
Figura 9. Concentración de bacterias degradantes TPH ( $\times 10^5$ UFCg <sup>-1</sup> ) y hongos degradantes TPH ( $\times 10^5$ UPC/g), al tiempo 0 y después de 90 días, en los tratamientos: bioaumentación y bioestimulación bacterias y hongos (Ba-Be-BH), bioaumentación y bioestimulación bacterias (Ba-Be-B), bioaumentación y bioestimulación hongos (Ba-Be-H). ....	33
Figura 10. Concentración de hongos degradantes TPH ( $\times 10^5$ UFCg <sup>-1</sup> ) y bacterias degradantes TPH ( $\times 10^5$ UFCg <sup>-1</sup> ), al tiempo 0 y después de 90 días, en los tratamientos: bioaumentación bacterias y hongos (Ba-BH), bioaumentación bacterias (Ba-B), bioaumentación hongos (Ba-H). ....	34

## 1. INTRODUCCIÓN

La explotación petrolera es una de las actividades que más contaminación causa en el ambiente, principalmente dentro de las comunidades y en las áreas de influencia de operación, sea sectorial, nacional e internacional, en sus distintas fases de exploración: transporte, refinamiento y comercialización. Los derrames de petróleo crudo en el suelo originan el desequilibrio en la biodiversidad y en el medio natural en general (Almeida, 2006).

En el Ecuador, desde 1990 la compañía Petroecuador ha aumentado sus operaciones en la región Amazónica. Ha llevado a una gran acumulación de contaminación en el ambiente. En el periodo entre 1995 y 2011, Petroecuador reconoció la existencia de 1983 derrames de petróleo en la región Amazónica, lo que corresponde a un derrame cada tres días mediante los 16 años de explotación petrolera. En estos derrames la petrolera estatal vertió al ambiente 129656 barriles de petróleo crudo ([www.juiciocrudo.com/articulo/2014](http://www.juiciocrudo.com/articulo/2014)).

Se han investigado distintas técnicas biológicas con el propósito de buscar alternativas de descontaminación en áreas impregnadas por petróleo crudo sea en el suelo y el agua. La biorremediación es un método de descontaminación en el que se usa una serie de reacciones bioquímicas por grupos definidos de microorganismos, que son inoculados en áreas contaminadas para biotransformar la estructura de los hidrocarburos en componentes menos tóxicos (Benavides et al., 2006).

Este proceso de biorremediación se fundamenta en la utilización de microorganismos para remover el petróleo crudo existente en el suelo. Constituye uno de los principales tratamientos para que los contaminantes hidrocarbonados puedan ser degradados del ambiente de una manera segura. Este proceso incluye la utilización de microorganismos seleccionados de áreas impregnados de hidrocarburos. Los géneros más usados son: *Pseudonimas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococos*, *Nocardia*, *Bacillus*,

*Vibrio*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Rhodotorula* y *Sporobolomice* (Johsen et al. 2002).

La presente investigación quiere dar seguimiento a estudios previos realizados por el Dr.C. Maddela Naja Raju, Ph.D., ex-Prometeo de la Universidad Estatal Amazónica (UEA). El realizó un estudio relacionado con la biorremediación ex situ con suelo contaminado por hidrocarburo de forma artificial, en la primera etapa permitió desarrollar dos tesis de pregrado con estudios in vitro aislando hongos (*Geomyces pannorum* y *Geomyces* sp.) y bacterias (*Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus*) de suelos contaminados con hidrocarburos (Montero, 2013; Valle, 2013).

La presente investigación consistió en determinar la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en el campo en condiciones ambientales, con microorganismos previamente aislados en laboratorio y microorganismos nativos de la amazonia, y la contaminación de las muestras de suelo se realizó de forma artificial con petróleo de forma manual.

## **Objetivos**

### **1.1 Objetivo general**

Determinar la capacidad biorremediadora de cepas tipos y cepas nativas de microorganismos de la Amazonía, en condiciones artificiales.

### **1.2 Objetivos específicos**

**OE1.-** Evaluar el efecto de los nutrientes (N, P, K, compost y aserrín) en la biodegradación de las muestras de suelo contaminado por petróleo, por parte de los microorganismos seleccionados.

**OE2.-** Comparar la capacidad biodegradadora de cepas bacterianas y hongos previamente aislados e identificados molecularmente.

**OE3.-** Evaluar la capacidad de biodegradar petróleo por parte de los microorganismos nativos presentes en las muestras de suelo.

### **1.3 Hipótesis general**

Mediante los métodos de bioestimulación y bioaumentación microbiana es posible biodegradar hidrocarburos de suelos Amazónicos en condiciones artificiales.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

El ser humano a partir de la revolución industrial ha actuado pensando que los recursos naturales fueran usables para su total beneficio, sin precautelar el posible daño que sus acciones iban a poder ocasionar al ambiente. La exploración de petróleo y su uso como fuente de energía principal mejoró las condiciones de vida, pero al mismo tiempo contaminó los suelos, el agua y el aire. En vista de la acelerada extracción de hidrocarburos que ocurrió a mediados de siglo XX, empezó por primera vez la preocupación de limpiar los sitios contaminados mediante la utilización de microorganismos con la técnica de labranza. Eso dio inicio a la “biorremediación” es decir a aquellos procesos que mediante el uso de microorganismos, hongos, plantas o derivados permiten que ambientes contaminados regresen a su estado natural o sin embargo en condiciones de menor contaminación (Zobell, 1946).

En el siglo XXI empezó el verdadero reto de buscar alternativas de biorremediación, desarrollando las técnicas de bioaumentación, bioestimulación y biodisponibilidad de microorganismos degradantes de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH), con el propósito de no causar mayor daño al ambiente donde se encontraban recursos naturales estratégicos como el suelo, el agua y el aire vivos (Torres *et al.* 2009).

Las técnicas utilizadas para remediar suelos contaminados con hidrocarburos suelen dividirse entre físico-químicas, térmicas y biológicas. La biorremediación microbiana es parte de estas últimas. Esa consiste en descontaminar suelos impregnados de petróleo mediante el uso de diversos microorganismos con capacidad metabólica de utilizar hidrocarburos como única fuente de carbono y de energía. Se conocen diferentes técnicas de descontaminación como la atenuación natural, la bioaumentación y la bioventilación. Diversas investigaciones se han ejecutado en diferentes lugares, tanto *in situ* como *ex situ*, con el propósito de biorremediar suelos contaminados, de forma amigable con la naturaleza. Estudios previos realizados por Muskus



Morales (2013), en suelos contaminados de forma artificial con diesel, después de 4 meses mostraron que la bioventilación (estimulación del crecimiento de microorganismo aerobios autóctonos mediante insuflación de aire) fue la técnica que dio el mejor resultado, alcanzando la remoción de hidrocarburos en un 97%. Así mismo la combinación de bioventilación y bioaumentación (enriquecimiento del suelo con microorganismos) mostró alto porcentaje de degradación (75%); mientras solo la técnica de la bioaumentación degradó los hidrocarburos por un 48%.

Otras investigaciones mostraron que la adicción de nutrientes, especialmente orgánicos, facilita la biorremediación por parte de los microorganismos autóctonos presentes en el suelo contaminado. La velocidad de degradación de hidrocarburos de larga cadena aumenta al adicionar compuestos orgánicos como compost o biosólidos. Aunque los fertilizantes sintéticos tengan también una acción positiva sobre la biodegradación, se ha registrado que los de origen orgánica tienen mayor efecto (Álvaro *et al.*, 2014).

La bioaumentación (microbiana y fúngica) es también una técnica ampliamente utilizada para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Investigaciones realizadas por Pernia *et al.* (2012) indicaron que los hongos con mayor capacidad biodegradadora fueron aquellos aislados de suelos impactados con crudo y asfalto natural y, por lo contrario, la diversidad menor se registró en hongos aislados de suelos con gasolina y diesel. Los géneros encontrados con mayor frecuencia fueron *Penicillium* (18%), *Aspergillus* (17%) y *Fusarium* (6%).

Nuevos estudios realizados por Tirado Torres *et al.*, (2015) demuestran que la combinación de diferentes consorcios de microorganismos aumenta la velocidad de degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), siendo estas las fracciones más peligrosas para los seres vivos. En estas investigaciones se reconocieron cinco consorcios microbianos diferentes; los ensayos *in vitro* dieron a conocer que los tratamientos con consorcio bacteriano

establecieron mayor a 80% de biorremediación en suelos contaminados con petróleo.

Otras investigaciones, realizadas en las provincias ecuatorianas de Sucumbíos y Orellana, permitieron aislar 166 cepas de bacterias y 22 especies de hongos, de suelos que estuvieron contaminados con petróleo durante 40 años. 64 cepas de bacterias demostraron mayor capacidad de degradación de hidrocarburos, entre estas los géneros más presentes fueron *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Chromobacterium*, *Aeromona*, *Burkholderia*, *Brevibacillus* y *Stenotrophomonas*.

Estos estudios previos de consorcios de bacterias y hongos se realizaron con el propósito de investigar la biodisponibilidad de microorganismos para la aplicación del tratamiento de bioaumentación en suelos contaminados con petróleo (Hidalgo *et al.*, 2008).

Otro estudio de biorremediación se realizó a escala de laboratorio utilizando dos tipos de suelo, uno arenoso y el otro franco arcilloso arenoso, recolectados a 20 cm de profundidad. Dichos suelos se contaminaron artificialmente con crudo mediano. El diseño del experimento se estableció mediante cuatro tratamientos, que tomaban en cuenta la textura del suelo como factor de estudio; de hecho se consideraron dos tratamientos con agente estructurante (adición de hojarasca) y dos sin agente estructurante. Se utilizaron varias especies de vegetales secos con diferentes contenidos de carbono y nitrógeno como suplemento de agente estructurante. El periodo del experimento fue de 90 días. Los suelos franco arcilloso arenosos fueron los que dieron mejores resultados en cuanto a la mayor remoción de hidrocarburos (García *et al.*, 2012).

Pino Rodríguez *et al.* (2012) realizaron experimentos en suelos contaminados con diesel, en Antioquia (Colombia), comparando bioestimulación, bioaumentación y atenuación natural, mediante 5 tipos de tratamientos diferentes: a) suelo esterilizado + hidrocarburo, b) suelo + hidrocarburo, c) inóculo de

microorganismos + adicción de hidrocarburo, d) suelo con hidrocarburo + N-P-K y e) suelo más hidrocarburo, N-P-K y restos orgánicos. El periodo de investigación fue de 30 días. El tratamiento que mejor resultado dio fue el de adicción de nutrientes N-P-K y restos de vegetales, alcanzando el 93% de degradación de HTP.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Localización y duración del experimento**

El trabajo de tesis se realizó en el Centro de Investigación, Posgrado y Conservación Amazónica (CIPCA), km. 33 vía Puyo –Tena y en los laboratorios de biología y suelo de la Universidad Estatal Amazónica en el Puyo. El experimento tuvo una duración aproximada de 8 meses.

#### **3.2 Condiciones meteorológicas**

El Cantón Santa Clara tiene una altitud de 600 m.s.n.m. con extensión de 310 km<sup>2</sup>. Se encuentra situado en la provincia de Pastaza, región central amazónica ecuatoriana, ubicación geográfica: Latitud 1° 20' 42'' (S), Longitud 77° 47' 47'' W. Las características climáticas principales son las siguientes: temperatura promedio entre 18 y 24°C (uniforme a lo largo de todo el año), precipitación promedio anual que supera los 3.000 mm, humedad relativa que oscila entre el 80 y el 90%.

#### **3.3 Materiales y equipos**

La investigación se realizó evaluando la capacidad biodegradadora de microorganismos nativos y microorganismos aislados en laboratorio, cuales los hongos *Geomyces pannorum* y *Geomyces* sp. y las bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus*, que conservaron a -86°C en el ultra congelador. su capacidad de

biodegradación fue comprobada *in vitro* en estudios previos (Maddela *et al.*, 2016).

A continuación se describen los materiales, equipos y métodos utilizados para alcanzar cada objetivo:

**MATERIALES:** Matraz (500 ml), vaso de precipitación (250 ml), tubos de ensayo, agitador magnético, mechero de alcohol, espátula, aza de metal, aza de vidrio, bureta (50 ml), placas porta objeto, cajas Petri, termómetro, marcador, cajas de madera.

**REACTIVOS:** Medio agar nutriente (500 g), medio agar patata dextrosa (500 g), caldo de sales mínimos (500 g), glicerol (100 g), ácido clorhídrico (100 ml), hidróxido de sodio (100 g), diesel (1 L), Tween-80 (500 ml), alcohol (1 galón), petróleo (5 galones), aserrín (10 kg), compost (5 kg), arena (5 kg) y algodón.

**EQUIPOS:** Autoclave, cámara de Neubauer, estufa, microscopio, cámara fotográfica, balanza portátil, balanza analítica, pH metro, espectrofotómetro, GPS, ultra congelador ( $-86^{\circ}\text{C}$ ), cromatógrafo de gases, incubadora y computadora.

### **3.4 Diseño experimental**

La investigación se realizó en el campo, en nueve cajones de madera; ocho cajones se utilizaron para los tratamientos y un cajón para testigo. Este experimento se realizó para determinar la capacidad biodegradadora de microorganismos previamente aislados en laboratorio y microorganismos nativos. Se aplicó comparación aritmética en los tratamientos y el testigo, a continuación se describe los métodos:

#### **-TESTIGO**

Evaporación (Ev): Se investiga la variación del contenido de HTP en un suelo previamente esterilizado y por ende libre de microorganismos;

- TRATAMIENTOS NATURALES:

- A) Atenuación natural (An): Se investiga la capacidad de los microorganismos nativos del suelo de biodegradar petróleo sin intervención antrópica;
- B) Estimulación natural (En): Se investiga la capacidad de los microorganismos nativos del suelo de biodegradar petróleo añadido de forma artificial, mediante la adición de nutrientes orgánicos e inorgánicos a la muestra de suelo.

-TRATAMIENTOS DE BIOAUMENTACIÓN Y BIOESTIMULACIÓN:

- A) Degradación bacteria y fúngica mediante bioaumentación y bioestimulación (Ba-Be-BH): Se investiga la capacidad degradadora de hidrocarburos de un consorcio de microorganismos formado por hongos y bacterias aislados en laboratorio, después de haber agregado petróleo de forma artificial a la muestra de suelo y nutrientes orgánicos e inorgánicos;
- B) Degradación bacteriana mediante bioaumentación y bioestimulación (Ba-Be-B): Se investiga la capacidad degradadora de hidrocarburos de dos cepas de bacterias aisladas en laboratorio, después de haber agregado petróleo de forma artificial a la muestra de suelo y nutrientes orgánicos e inorgánicos;
- C) Degradación fúngica mediante bioaumentación y bioestimulación (Ba-Be-H): Se investiga la capacidad degradadora de hidrocarburos de dos especies de hongos aislado en laboratorio, después de haber agregado petróleo de forma artificial a la muestra de suelo y nutrientes orgánicos e inorgánicos.

- TRATAMIENTOS DE BIOAUMENTACIÓN:

- A) Degradación bacteriana y fúngica mediante bioaumentación (Ba-BH): Se investiga la capacidad degradadora de hidrocarburos por parte de un consorcio de hongos y bacterias aislados en laboratorio por su capacidad biodegradadora, en una muestra de suelo contaminado por petróleo de forma artificial;

- B) Degradación bacteriana mediante bioaumentación (Ba-B): Se investiga la capacidad degradadora de hidrocarburos por parte de dos cepas de bacterias aisladas en laboratorio por su capacidad biodegradadora, en una muestra de suelo contaminado por petróleo de forma artificial;
- C) Degradación fúngica mediante bioaumentación (Ba-H): Se investiga la capacidad degradadora de hidrocarburos por parte de dos especies de hongos aislados en laboratorio por su capacidad biodegradadora, en una muestra de suelo contaminado por petróleo de forma artificial.

Después de 90 días de inoculación, se tomaron 3 sub muestras de suelo por cada tratamiento y el testigo, se realizaron los análisis físico-químicos, TPH residual y microbiológicos correspondientes. En la Tabla 1 se resumen las características del testigo y los tratamientos objeto de estudio.

Tabla 1 .Características y siglas del testigo y los tratamientos investigados.

<i>Tratamientos</i>	<i>Siglas</i>	<i>Características</i>
-Test.Evapoaración	Ev	Muestra de suelo esterilizado y evaporación de HTP
1-Atenuación natural	An	Degradación de HTP por microorganismos nativos, sin intervención antrópica
2-Estimulación natural	En	Adición de nutrientes al suelo para estimular la degradación de HTP por parte de los microorganismos nativos
3-Bioaumentación con bacterias y hongos + Bioestimulación	Ba-Be-BH	Adición de microorganismos seleccionados degradadores de HTP (bacterias y hongos) y nutrientes
4-Bioaumentación con bacterias + Bioestimulación	Ba-Be-B	Adición de bacterias seleccionados degradadores de HTP y nutrientes
5-Bioaumentación con hongos + Bioestimulación	Ba-Be-H	Adición de hongos seleccionados degradadores de HTP y nutrientes
6-Bioaumentación con bacterias y hongos	Ba-BH	Adición de microorganismos degradadores de HTP (bacterias y hongos)
7-Bioaumentación con bacterias	Ba-B	Adición de bacterias seleccionados degradadores HTP.
8-Bioaumentación con hongos	Ba-H	Adición de hongos seleccionados degradadores HTP.

\* Las muestras de suelo de todos los tratamientos y el testigo han sido adicionadas de petróleo

Leyenda: HTP=Hidrocarburos Totales de Petróleo, Ba=Bioaumentación, Be=Bioestimulación, B=Bacterias, H=Hongos

### **3.5 Variables a evaluar**

- pH: Se midió el pH final del experimento mediante un pH metro, por cada tratamiento;
- Crecimiento de los microorganismos: Se realizó el análisis microbiológico de los tratamientos correspondientes, llegando a determinar la concentración final de microorganismos degradadores de HTP expresada en UFC g suelo<sup>-1</sup>.
- Concentración de HTP: Se realizó el análisis químico mediante cromatografía de gases, de los tratamientos correspondientes, llegando a determinar la concentración inicial y final de hidrocarburos totales.

### **3.6 Manejo del experimento**

#### **3.6.1 Preparación de los cajones**

Se prepararon 9 cajones de madera de 30 cm de largo, 30 cm de ancho y 15 cm de alto, de las cuales los ocho cajones corresponden a tratamientos y un cajón corresponde al testigo. Los cajones fueron lavados con agua estéril tres veces y puestos sobre la superficie del suelo a temperatura ambiente y a condiciones climáticas del lugar. Los ocho cajones se rellenaron con 20 lbs de suelo natural y el suelo para el cajón del testigo fue esterilizado en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Todos los tratamientos y el testigo fueron adicionados de petróleo, en una cantidad del 5% (correspondiente a 500 ml). Los nutrientes orgánicos e inorgánicos y agentes de volumen fueron adicionados solo en los tratamientos de bioestimulación con 337 g de compost, 930 g de aserrín, 37,2 g NPK y 200 g arena.



### 3.6.2 Elaboración del inoculo microbiano

Los microorganismos fueron previamente aislados de suelos amazónicos del Ecuador (Sucumbíos), contaminados con petróleo y su capacidad degradadora fue comprobada *in vitro*. Las bacterias utilizadas fueron *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus* (Figura 1), mientras los hongos fueron *Geomyces pannorum* y *Geomyces* sp. (Figura 2) (Maddela *et al.*, 2016)

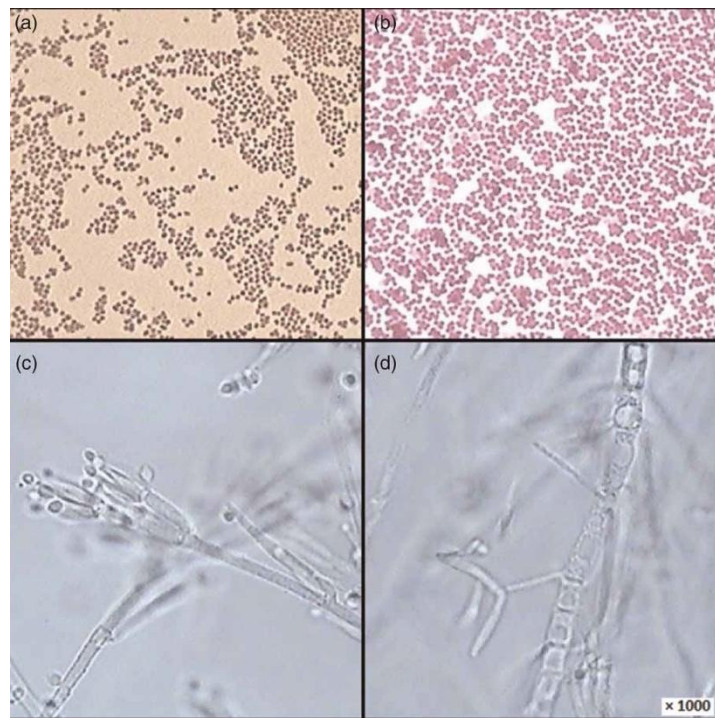


Figura 1. Imágenes al microscopio de las bacterias (a) *Bacillus cereus*, (b) *Bacillus thuringiensis* y de los hongos (c) *Geomyces pannorum* y (d) *Geomyces* sp. (Maddela *et al.*, 2016)

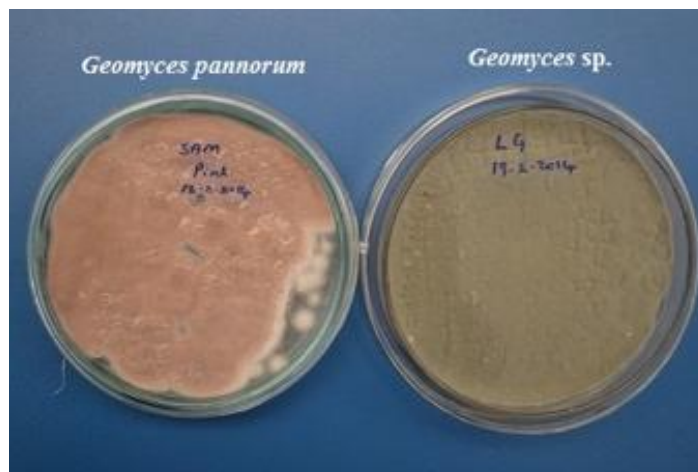


Figura 2. Hongos *Geomyces pannorum* y *Geomyces* sp. en cajas Petri con medio de cultivo PDA (Maddela *et al.*, 2016)

La elaboración del inóculo se realizó a partir de las cepas conservadas en ultra-congelador a  $-86^{\circ}\text{C}$ . Las bacterias fueron descongeladas y cultivadas *in vitro* en agar nutritivo, a pH 7,4 e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por un tiempo de 72 horas. Los hongos fueron cultivados *in vitro* en agar patata dextrosa, a pH 5,5, a  $25^{\circ}\text{C}$ , por un tiempo de 5 días.

### 3.6.3 Elaboración del portador granulado de maíz

Para inocular los microorganismos en campo se preparó un portador.

La elaboración del portador granulado se realizó, a partir de mazorca de maíz en buen estado, se secó en la estufa a  $70^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, se trituroó en el molino hasta convertir en granulado, luego se esterilizó el granulado en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos y se conservó en una funda hermética en refrigeración. Para el cálculo de % de humedad del granulado de maíz se realizó el siguiente procedimiento:

Se pesó 1 g de granulado de maíz y a la par se preparó una probeta con 10 ml de agua destilada. El gramo del granulado se colocó en un tubo de ensayo. Luego se agregó el agua destilada de la probeta al tubo de ensayo que contenía el

granulado hasta cubrir de la parte superior de 3,24 ml de agua destilada consumida y se analizó mediante regla de tres:

100% — 3,24 ml agua consumida

70% —  $X = 70 \times 3,24 / 100 = 2,26$  ml de agua/1 g de granulado

Calculo del 70 % de humedad para 100 g de granulado de maíz

1g de granulado de maíz — 2,26 ml de agua destilada

100 g de granulado de maíz —  $X = 227$  ml de agua destilada

Calculo para Tween 80

1ml — 1000  $\mu$ l

0,1ml —  $X = 100$   $\mu$ l

Se pesó 100 g de granulado mazorca de maíz en cada funda hermética, 4 fundas, cada una con 100 g de granulado, a la par cuarto matraces de 500 ml, en cada matraz se pusieron 227 ml de agua destilada, dos matraces ( que van a contener hongos) se puso Tween 80 (100  $\mu$ l). Luego se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Las bacterias previamente cultivadas en cajas Petri, se pasaron a un medio líquido de 227 ml de agua estéril, mediante una asa estéril. Se calculó la concentración bacteriana, mediante un espectrofotómetro con la lectura (1 OD<sub>600nm</sub>), siendo la concentración final de bacterias de  $10^8$  UFCml<sup>-1</sup>. Luego se agrego la solución bacteriana a la funda que contenia los 100 g de granulado de mazorca de maíz.

Los hongos cultivados en cajas Petri, se pasaron a un medio liquido de 227 ml de agua esteril mediante un sacabocado esteril. Se calculo la concentración fúngica, mediante un espectrofotómetro con lectura (1 OD<sub>600nm</sub>) siendo la concentración final de  $10^4$  UPCml<sup>-1</sup>.

Los inóculos fueron preparados de la siguiente manera:

-100 g de granulado mazorca de maíz + 227 ml de agua estéril +  $10^8$  UFCml<sup>-1</sup> de

*B. thuringiensis*

-100 g de granulado mazorca de maíz + 227 ml de agua estéril +  $10^8$  UFCml<sup>-1</sup> de

*B. cereus*

-100 g de granulado mazorca de maíz + 227 ml de agua estéril +  $10^4$  UPC ml<sup>-1</sup> *G.*

*pannorum*

-100 g de granulado mazorca de maíz + 227 ml de agua estéril +  $10^4$  UPC ml<sup>-1</sup>

*Geomyces* sp.

Finalmente, se transportaron los inóculos del laboratorio al campo, para luego ser agregados a las muestras de suelo contaminado de forma artificial con petróleo en sus respectivos tratamientos (Maddela *et al.*, 2016).

### **3.6.4 Preparación de los tratamientos y el testigo en el campo**

Después de establecer los cajones en el campo, se procedió a preparar el contenido de insumos y materiales, para cada tratamiento y el testigo. Luego se continuó mezclando manualmente 2 veces a la semana durante los 90 días, los siete tratamientos y el testigo, excepto el tratamiento de atenuación natural. A continuación se describen el procedimiento de aplicación de insumos y materiales en cada tratamiento y el testigo:

#### Testigo:

Evaporación de HTP: previamente se esterilizaron 20 lbs de suelo en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, luego se agregaron 500 ml de petróleo.

#### Tratamiento Atenuación natural (An):

Previamente se colocaron 20 lbs de suelo natural, luego se agregó 500 ml de petróleo y no hubo intervención antropica.

#### Tratamiento Estimulación natural (En):

Previamente se colocaron 20 lbs de suelo natural, luego se agregaron nutrientes orgánicos e inorgánicos y agentes de volumen (337 g de compost, 930 g de aserrín, 37,2 g NPK y 200 g arena) finalmente se agregaron 500 ml de petróleo.

Tratamiento bioaumentación y bioestimulación bacterias y hongos (Ba-Be-BH):

Previamente se colocaron 20 lbs de suelo, luego se adicionó nutrientes orgánicos e inorgánicos y agentes de volumen (337 g de compost, 930 g de aserrín, 37,2 g NPK, 200 g arena), 500 ml de petróleo y finalmente se agregó la solución sólida de hongos y bacterias:

- 25 g de granulado mazorca de maíz con bacteria *Bacillus thuringiensis*
- 25 g de granulado mazorca de maíz con bacteria *Bacillus cereus*
- 25 g de granulado mazorca de maíz con hongo *Geomyces pannorum*
- 25 g de granulado mazorca de maíz con hongo *Geomyces* sp

Tratamiento bioaumentación y bioestimulación bacterias (Ba-Be-B):

Previamente se colocaron 20 lbs de suelo, luego se adicionaron nutrientes orgánicos e inorgánicos y agentes de volumen (337 g de compost, 930 g de aserrín, 37,2 g NPK y 200 g arena), 500 ml de petróleo y finalmente se agregó la solución sólida bacteriana:

- 25 g de granulado mazorca de maíz con bacteria *Bacillus thuringiensis*
- 25 g de granulado mazorca de maíz con bacteria *Bacillus cereus*

Tratamiento; bioaumentación y bioestimulación hongos (Ba-Be-H):

Previamente se colocaron 20 lbs de suelo, luego se adicionaron nutrientes orgánicos e inorgánicos y agentes de volumen (337 g de compost, 930 g de aserrín, 37,2 g NPK y 200 g arena), 500 ml de petróleo y finalmente se agregó la solución sólida de hongos:

- 25 g de granulado mazorca de maíz con hongo *Geomyces pannorum*
- 25 g de granulado mazorca de maíz con hongo *Geomyces* sp

Tratamiento bioaumentación bacterias y hongos (Ba-BH):

Previamente se colocaron 20 lbs de suelo, luego se agregaron 500 ml de petróleo y finalmente se adicionó la solución sólida de hongos y bacterias:

- 25 g de granulado mazorca de maíz con bacteria *Bacillus thuringiensis*
- 25 g de granulado mazorca de maíz con bacteria *Bacillus cereus*
- 25 g de granulado mazorca de maíz con hongo *Geomyces pannorum*
- 25 g de granulado mazorca de maíz con hongo *Geomyces* sp

Tratamiento bioaumentación bacterias (Ba-B):

Previamente se colocaron 20 lbs de suelo, luego se agregaron 500 ml de petróleo y finalmente se adiciono la solución sólida de hongos y bacterias:

- 25 g de granulado mazorca de maíz con bacteria *Bacillus thuringiensis*
- 25 g de granulado mazorca de maíz con bacteria *Bacillus cereus*

Tratamiento bioaumentación hongos (Ba-H):

Previamente se colocaron 20 lbs de suelo, luego se agregaron 500 ml de petróleo y finalmente se adiciono la solución sólida de hongos:

- 25 g de granulado mazorca de maíz con hongo *Geomyces pannorum*
- 25 g de granulado mazorca de maíz con hongo *Geomyces* sp

### **3.6.5 Extracción y análisis de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) por cromatografía de gas**

La determinación de HTP en las muestras de suelo de los tratamientos fue realizada en el laboratorio CESTTA de la Escuela Superior Politecnica de Chimborazo (ESPOCH), en Riobamba, por gascromatografía (GC). El análisis de HTP se realizó al inicio de la investigación y después de 3 meses. A tal fin, por cada tratamiento, se tomó una muestra de suelo equivalente a 10 g de peso seco y se mezcló con sulfato de sodio anhidro (5 g) en un frasco Enrlenmeyer.

Posteriormente se agregaron 100 ml de hexano y se agitar con ultrasonido. Una cantidad de extracto se inyectó en el GC/FID con una columna HP-5. La temperatura del horno fue programada de 40 a 280 °C, con una variación e 12 °C/min, mantenida por 20 minutos, y luego mantenida por 8 min a 280 °C. El carrier y los gases fueron nitrógeno y helio respectivamente y la ratio fue de 1:10. La cantidad de HTP fue determinada comparando los picos de las áreas de los cromatogramas con estándares de compuestos de alcanos (C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub>) y expresada en términos de proporción de degradación (Maddela *et al.*, 2016). La fórmula utilizada para obtener los valores de TPH fue la siguiente:

$$\text{DEGRADACION (\%)} = [(\text{valor inicial}-\text{valor final})/\text{valor inicial}] \times 100$$

### **3.6.6 Analisis fisico-químico del suelo**

Para realizar los análisis físico-químicos de los suelos de los tratamientos, se procedió a tomar 3 submuestras de suelo de aproximadamente 50 g cada una. Se realizaron los siguientes ensayos:

- **pH**

Para determinar el pH se pesaron 10 g de muestra de suelo, por cada tratamiento, en un vaso de precipitación de 100 ml, luego se agregaron 25 ml de agua destilada y se agitó a 400 rpm durante 5 minutos; posteriormente se dejó en reposo durante 30 minutos y se procedió a tomar la lectura mediante el pH-metro. Cada medición se realizó por triplicado (Thomas, 1996).

- **Contenido en nitrógeno (N)**

Para la determinación del contenido en nitrógeno se pesaron 0,2 g de muestra de suelo, 1,1 g de catalizador de nitrógeno y se puso en un balón; posteriormente se agregaron 3 ml de ácido sulfúrico en la cabina de extracción de gases, luego se digesto mediante Kjeldahl (Figura 5) durante 60 minutos y se dejó enfriar por 15

minutos. A continuación se agregaron 100 ml de agua destilada. Para la destilación, se agregaron en el balón ya digestado 10 ml de hidróxido de sodio y a la par se prepararon, en un matraz de 250 ml, 10 ml de ácido bórico adicionado de 5 gotas de indicador tashiro. Posteriormente se colocaron en el digestor Kjeldahl, el balón y el matraz durante 15 a 20 minutos hasta que cambió el color del contenido, de morado a verde. Sucesivamente se tituló con ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ). Cada tratamiento se realizó por duplicado (El-Attar & Jackson, 1973). Los valores finales se obtuvieron utilizando la siguiente fórmula:

$$N\% = \frac{(V - B) \times N \times 14}{P \times 10}$$

$V$  = Volumen de ácido sulfurico para titulación muestra

$B$  = Volumen de ácido sulfurico para titulación blanco

$N$  = Normalidad ácido sulfurico (0,2)

14 = Peso equivalente del nitrogeno

$P$  = Peso de la muestra en gramos

10 = Factor para convertir a porcentaje

- **Contenido en carbono orgánico (C)**

Se pesaron 0,1 g de muestra de suelo, se trituraron y se tamisaron en un sedaso de 250  $\mu m$ ; posteriormente la muestra se colocó en un matraz de 500 ml. El matraz con el suelo se colocó en una hornilla eléctrica dentro de la cabina de extracción de gases, se agregaron 10 ml de ácido sulfúrico y 5 ml de dicromato de potasio. Se dejó durante 30 minutos en la hornilla, luego se dejó enfriar y se agregaron 100 ml de agua destilación; a continuación se agregaron 5 ml de ácido fosfórico y se dejó enfriar durante 30 minutos. La titulación se realizó utilizando una probeta graduada con sal de mol; a la muestra digestada se agregaron 5 gotas de difenilamina en cada matraz. El matraz con el contenido se colocó debajo de la bureta para agregar sal de mol hasta convertir el color de morado a verde esmeralda y se anotó el consumo para luego calcular el porcentaje de C (Nelson & Sommers, 1996). Los valores finales se obtuvieron utilizando la siguiente formula:



$$C\% = \frac{(V_o - V) \times N \times 0,39}{PM}$$

$V_o$  = Volumen de solución de sal de Morsh en la titulación del blanco

$V$  = Volumen de solución de sal de Morsh en la titulación de la muestra

$N$  = Normalidad de la solución de sal de Morsh (0,5)

0,39 = constante (“ $3 \times 1,3/100$ ”, donde 3 es el peso equivalente del carbono y 1,3 es el factor de compensación por la combustión incompleta de la materia orgánica).

$PM$ : Peso de la muestra

- **Contenido en fósforo (P)**

Se pesaron 2,5 g de muestra de suelo en un vaso de precipitación de 100 ml, luego se agregaron 30 ml de agua destilada y se dejó reposar durante 6 minutos. Posteriormente se filtró mediante papel filtro en un matraz de 250 ml. A la par se prepararon 20 tubos de ensayo con 0,5 ml de muestra filtrada, 4 ml de agua destilada y 0,5 ml de reactivo Bartha, en cada tubo. Cada ensayo se realizó por duplicado (Lu, 1999). Los valores finales se obtuvieron utilizando la siguiente fórmula:

$$X = \frac{Y + 0,001}{0,0788}$$

$X$  = Concentración de fósforo

$Y$  = Lectura de absorbancia del espectrofotómetro visible

0,001 y 0,0788 = constantes de la ecuación de curva

### **3.6.7 Análisis microbiológico del suelo**

Muestras de ocho tratamientos y un testigo fueron analizadas microbiológicamente para determinar los siguientes ensayos:

- Bacterias degradadoras de HTP (diesel)
- Hongos degradadores de HTP (diesel)

Las bacterias y hongos degradantes fueron determinados mediante la tecnica de numero más probable en placa por diluciones sucesivas cuantitativas (Figura 3).

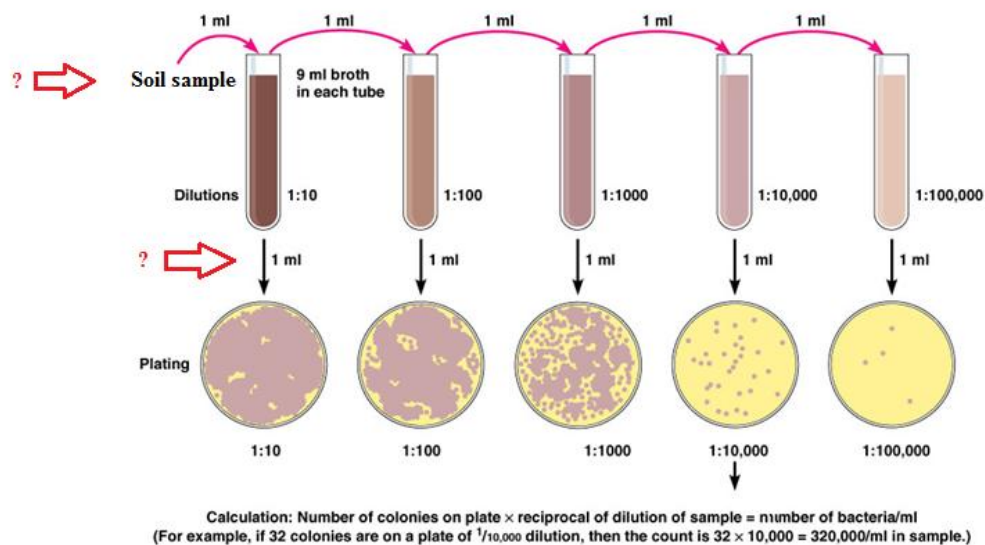


Figura 3. Esquema de las diluciones cuantitativas para determinar la cantidad (UFC g suelo<sup>-1</sup>) de microorganismos degradantes de HTP en una muestra de suelo.

Para la determinación de bacterias y hongos biodegradadores de petróleo se utilizó. Sulfato de magnesio ( $\text{Mg SO}_4$ )=0,2 g l<sup>-1</sup>, Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ )=0,02 g l<sup>-1</sup>, Fosfato mono potásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )=1,0 g l<sup>-1</sup>, Fosfato di potásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )=1,0 g l<sup>-1</sup>, Cloruro férrico ( $\text{FeCl}_2$ )=0,05 g l<sup>-1</sup>, Nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )=1,0 g l<sup>-1</sup>, calculando por regla de tres:

Ejemplo 1000 ml  $\longrightarrow$  0,2 Mg SO<sub>4</sub>

200 ml x  $\longrightarrow$

También se calcularon el agar granulado 20 g l<sup>-1</sup> por regla de tres:

1000 ml  $\longrightarrow$  20 g agar granulado

200 ml  $\longrightarrow$  x= 4 g de agar granulado, preparar para los dos

matraz.

Luego se ajustó el pH=7,4 para bacterias y pH=5,5 para hongos, todo esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Luego que esté solidificado el agar de sales mínimos se agregó 0,1 ml de diesel en todas las cajas Petri, 0,1 ml de muestra de suelo de acuerdo al método de diluciones sucesivas, tanto para las bacterias que para hongos. Se puso a incubar las bacterias a 37 °C y los hongos a 25 °C .

La concentración de microorganismos se determinó mediante la técnica de número más probable (NMP), luego se consideraron la Petri con 30 y 300 colonias.

$$= N^0 \text{ mo g suelo}^{-1} = \text{NMP} * \text{dilución}$$

$$600 * 1/10^{-5} = 600 * 10^5 = 6.10^7 \text{ UFC g suelo}^{-1}$$

### 3.6.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los ensayos realizados de hidrocarburos totales de petroleo (HTP), mediante cromatografía de gases, se demostraron mediante aritmética.

## 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN

### 4.1 Cromatografía de gases de los TPH del suelo

Los tratamientos que dieron los mejores resultados, en términos de degradación de hidrocarburos, f aquellos con bioaumentación y bioestimulación de forma conjunta (Tabla 2). De hecho, el mejor, tratamiento en absoluto fue Ba-Be-BH, es decir él de bioaumentación en cultivo mixto (bacterias: *B. thuringiensis* *B. cereus*; hongos: *G. pannorum* y *Geomyces* sp.) y bioestimulación (nutrientes orgánicos e inorgánicos). Los tratamientos que siguen fueron Ba-Be-B (bioaumentación con bacterias *B. thuringiensis*, *B. cereus* + bioestimulación) y Ba-Be-H (bioaumentación con hongos *G. pannorum* y *Geomyces* sp.

Los resultados obtenidos en cuanto a TPH residuales fueron de 322, 1925 y 1993 mg kg<sup>-1</sup> en el cultivo mixto, hongos *Geomyces* y bacterias *Bacillus*

respectivamente. Dichos valores de TPH residuales permitieron calcular la tasa de degradación de hidrocarburos, la misma que fue de 97,42% para el cultivo mixto, de 84,60% para los hongos *Geomyces* y de 84,06% para las bacterias *Bacillus* (Tabla 3)

Tabla 2. – TPH residuales y porcentaje de degradación de TPH después de 90 días, en los diferentes tratamientos

<i>Testigo y Tratamiento</i>	<i>Características tratamientos</i>	<i>TPH residual (mgkg<sup>-1</sup>)</i>	<i>Degradación (%)</i>
Testigo. Ev	Evaporación	9995,74±39,10	20,00
An	Microorganismos nativos	11875,00±0,00	5,00
En	Nutrientes + microorganismos nativos	5050,91±27,75	59,59
	Nutrientes + <i>B. thuringiensis</i>		
Ba-Be-BH	<i>B. cereus</i>	322,66±20,57	97,42
	<i>G. pannorum</i>		
	<i>Geomyces</i> sp.		
	Nutrientes +		
Ba-Be-B	<i>B. thuringiensis</i> B.	1993,04±45,83	84,06
	<i>cereus</i>		
	Nutrientes +		
Ba-Be-H	<i>G. pannorum</i>	1925,14±14,06	84,60
	<i>Geomyces</i> sp.		
	<i>B. thuringiensis</i>		
Ba-BH	<i>B. cereus</i>	6191,02±10,23	50,47
	<i>G. pannorum</i>		
	<i>Geomyces</i> sp.		
Ba-B	<i>B. thuringiensis</i> B.	6007,9±4,98	51,94
	<i>cereus</i>		
	<i>G. pannorum</i>		
Ba-H	<i>Geomyces</i> sp.	4672,37±39,24	62,62

**Leyenda:** An=Atenuación natural; Ev=Evaporación natural; En=Bioestimulación natural; Ba-Be-BH=Bioaumentación + Bioestimulación bacterias y hongo; Ba-Be-B= Bioaumentación + Bioestimulación bacterias; Ba-Be-H=Bioaumentación + Bioestimulación hongo

Tabla 3. Estadística aritmética

SIGLAS	DETALLE	ARITMÉTICA HTP residual (mg kg <sup>-1</sup> )
Ba-Be-BH	Bioaumentación y bioestimulación bacterias y hongos	322,66
Ba-Be-H	Bioaumentación y bioestimulación hongos	1925,14
Ba-Be-B	Bioaumentación y bioestimulación bacterias	1993,04
Ba-H	Bioaumentación hongos	4672,37
En	Estimulación natural	5050,01
Ba-B	Bioaumentación bacterias	6007,9
Ba-BH	Bioaumentación bacterias y hongos	6191,02
Ev	Testigo,	9995,74
An	Atenuación natural	11875

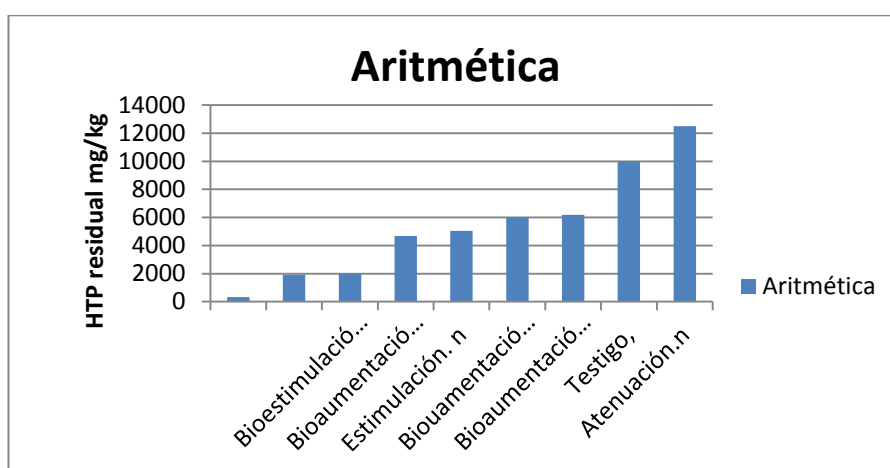


Figura 8 – TPH residuales (mg kg<sup>-1</sup>) en suelo, después de 90 días. Prueba mediante aritmética

#### 4.2 Efecto de los nutrientes (bioestimulación) en la biodegradación de TPH, microorganismos nativos.

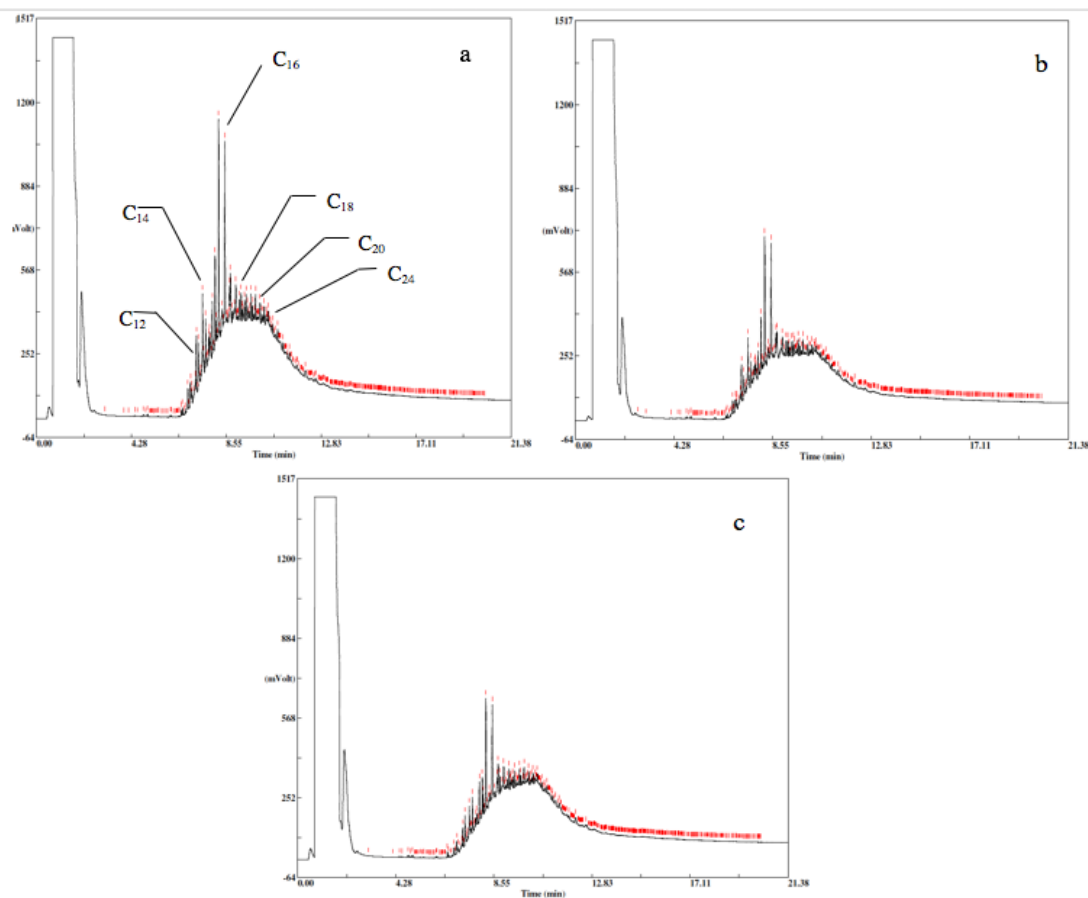


Figura 4. Gas-cromatogramas de los TPH residuales en el suelo después de 90 días, en los siguientes tratamientos: (a) Atenuación natural; (b) Evaporación; (c) Estimulación natural.

En la Figura 4 se reportan los cromatogramas de los tratamientos Atenuación natural (An), Evaporación (Ev) y Estimulación natural (En). En los cromatogramas “b” y “c” se observa una disminución de los picos que corresponden a los hidrocarburos C18, C20 y C24, lo cual significa que los microorganismos nativos fueron capaces de degradar dichos compuestos, alcanzando obtener un 59,59% y un 20,03% de degradación de TPH respectivamente para el tratamiento En y Ev. Los valores de TPH residuales registrados fueron respectivamente de 5050,91 y 9.995,74  $\text{mgkg}^{-1}$ .

En cambio en el tratamiento An no hubo ninguna degradación de TPH, lo cual sugiere que los microorganismos nativos del suelo no tuvieron capacidad degradadora. Sin embargo se destaca que al agregar nutrientes, tanto orgánicos como inorgánicos, se crearon condiciones aptas para impulsar la degradación de TPH y eso fue demostrado por los resultados del tratamiento “En”, en el cual como se dijo se adicionaron nutrientes.

Otras investigaciones mostraron que la adicción de nutrientes, especialmente orgánicos, facilita la biorremediación por parte de los microorganismos autóctonos presentes en el suelo contaminado. La velocidad de degradación de hidrocarburos de larga cadena aumenta al adicionar compuestos orgánicos como compost o biosólidos. Aunque los fertilizantes sintéticos tengan también una acción positiva sobre la biodegradación, se ha registrado que los de origen orgánica tienen mayor efecto (Álvaro *et al.*, 2014).

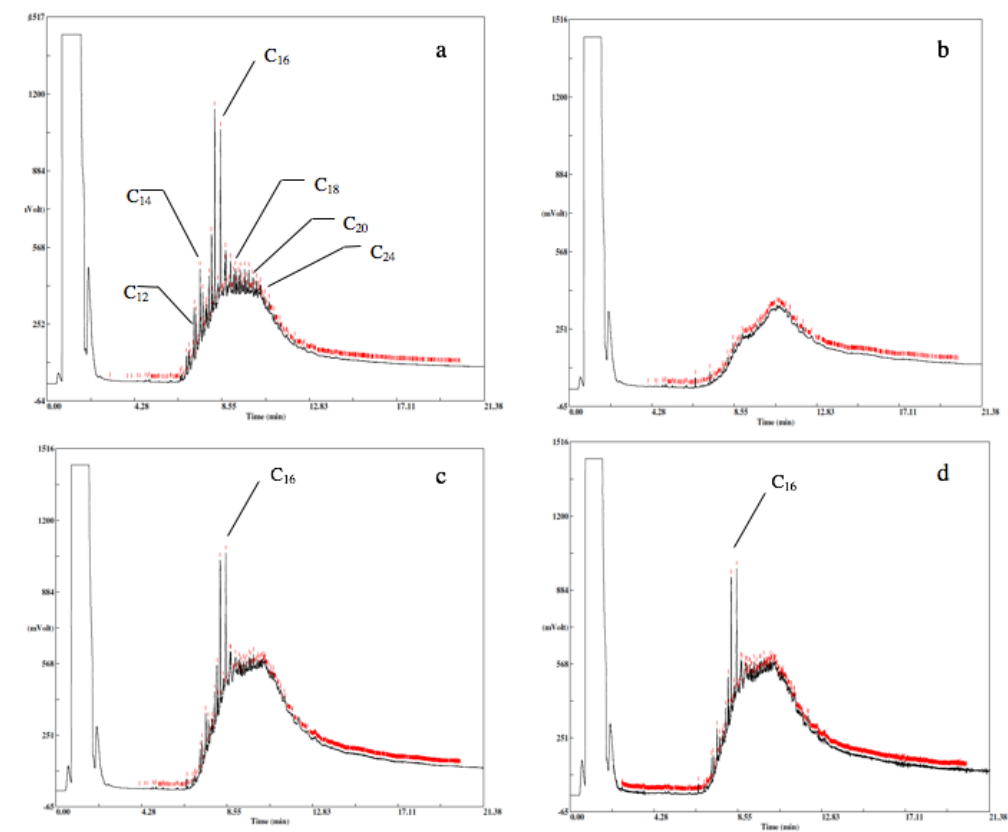


Figura 5. Gas-cromatogramas de los TPH residuales en el suelo después de 90 días, en los tratamientos con Bioaugmentación y Bioestimulación. (a) Atenuación natural; (b) Ba-Be-BH; (c) Ba-Be-B; (d) Ba-Be-H

En el cromatograma “b” de la Figura 5, se observa una relevante disminución de los picos correspondientes a los hidrocarburos desde C<sub>12</sub> hasta C<sub>24</sub>, lo cual significa que las bacterias (*B. thuringiensis* y *B. cereus*) y los hongos (*G. pannorum* y *Geomyces* sp.) que formaron el cultivo mixto, en presencia de nutrientes orgánicos e inorgánicos, fueron capaces de actuar de forma complementaria y degradar hasta el 97,42% de TPH. En los cromatogramas “c” y “d” se observa el comportamiento de las bacterias *Bacillus* spp. y los hongos *Geomyces* spp. Los resultados demuestran que el tratamiento con cultivo mixto fue el que degradó mejor los TPH, comparado con los otros dos tratamientos donde actuaron de forma individual los hongos y las bacterias. Lo mismo se observa en la degradación de las fracciones de n-alcenos. La abundancia de C16 en los mencionados tratamientos fue de 6.140 (8 minutos) para el cultivo mixto, 33.173 (7.99 minutos) para los hongos y 3.159.122 (8.05 minutos) para las bacterias.

La degradación de los compuestos C16 en el cultivo mixto puede ser explicada por la presencia de simbiosis mutualista entre hongos y bacterias frente a un mismo tipo de contaminante. De hecho en otros estudios realizados sobre diesel, se ha comprobado que la degradación de compuestos alifáticos se realiza de forma compartida entre diferentes comunidad microbianas, ya que algunas son capaces de degradar algunos compuestos y otras se han especializado en la degradación de otro, actuando así de forma sinérgica (Ciric, Philp, & Whiteley, 2010).

Considerando los resultados obtenidos, se pudo constatar que todos los tratamientos de bioestimulación, es decir de adición de nutrientes, fueron los que dieron mejores resultados en términos de degradación de TPH, en este orden: Ba-Be-BH > Ba-Be-H > Ba-Be-B > En. Este comportamiento ha sido confirmado también en otros estudios, realizado en Colombia, sobre suelos contaminado de forma artificial. Después de 30 días del inóculo, el tratamiento de adición de nutrientes inorgánicos N-P-K y restos de vegetales (bioestimulación) fue el que degradó por un 93% a los TPH (Pino Rodríguez *et al.*, 2012).



#### 4.3 Capacidad biodegradadora de TPH de hongos *Geomyces* spp. y bacterias *Bacillus* spp.

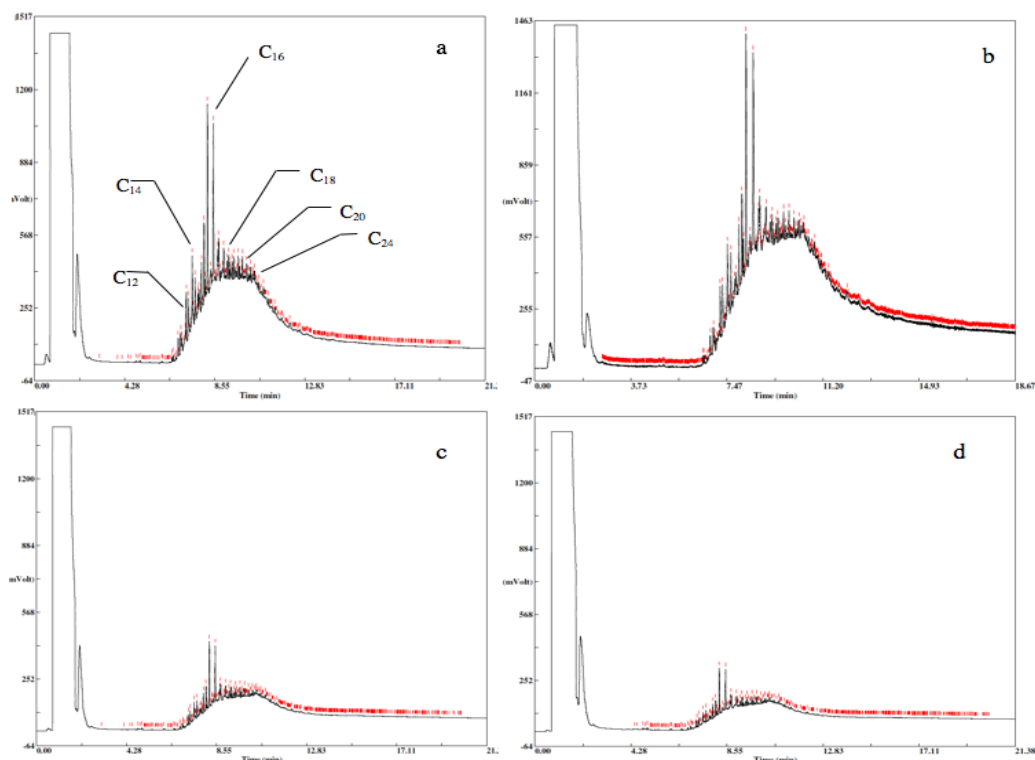


Figura 6. Gas-cromatogramas de los residuos de HTP en el suelo después de 90 días, en los tratamientos con Bioaumentación. (a) Atenuación natural; (b) Ba-BH; (c) Ba-B; (d) Ba-H

En las Figuras 10 y 11 se reportan los cromatogramas referidos a los tratamientos de bioestimulación+bioaumentación (Be-Ba) y bioaumentación (Ba). Observando los cromatogramas “b”, “c” y “d” y la correspondiente caracterización química en el Anexo 1, se nota que los microorganismos inoculados han tenido la capacidad de degradar los hidrocarburos registrando valores de TPH residuales de 6.191,02, 6.007,90 y 4.672,37  $\text{mgkg}^{-1}$  correspondientes respectivamente al cultivo mixto (b), a las bacterias *Bacillus* spp. (c) y a los hongos *Geomyces* spp. (d). Dichos valores de THP residuales llegan a determinar una degradación de 62,62% para hongos, 51,94% para bacterias y 50,47% para el cultivo mixto. Dichos resultados son superiores a aquellos obtenidos por Muskus Morales (2013), en estudios también realizados en

suelos contaminados de forma artificial, donde los tratamientos de bioaumentación degradaron el 48% de TPH.

En los tratamientos de bioaumentación de la presente investigación los hidrocarburos C16 fueron los más abundantes lo cual significa que fueron los menos degradados por parte de los microorganismos, como se refleja también en los cromatogramas de la Figura 10. De estos resultados se observa que la capacidad de degradar TPH es mucho mayor en los microorganismos por separado que en forma de cultivo mixto (Figura 11, cromatograma b).

Los microorganismos conocidos *Geomyces* spp. y *Bacillus* spp., utilizados en la bioaumentación, han confirmado su capacidad de degradar hidrocarburos también en este estudio experimental, aunque han mostrado una mayor eficiencia degradadora cuando se le suministra nutrientes orgánicos e inorgánicos, como reflejado en los tratamientos de bioestimulación.

De hecho el cultivo mixto con nutrientes registró una degradación de hidrocarburos de 97,42% mientras sin nutrientes de 50,47%, las bacterias *Bacillus* spp. de 84,06% con nutrientes y 51,94% sin nutrientes, y los hongos *Geomyces* spp. de 84,60% con nutrientes y 62,62% sin nutrientes. En la Tabla 5 se evidencia la proporción del incremento de degradación de TPH al agregar nutrientes en el suelo. En el cultivo mixto se registró un aumento del 51,80%, en el tratamiento con los hongos *Geomyces* spp. del 26,00% y en el tratamiento con las bacterias *Bacillus* spp. del 38,60%.

Tabla 4. Comparación de la degradación de TPH entre los tratamientos con y sin nutrientes, y proporción de incremento de degradación

Tratamiento	Degradación TPH	Degradación TPH	Proporción de incremento*
	CON	SIN	
	NUTRIENTES	NUTRIENTES	
	(Be-Ba)	(Ba)	
Cultivo mixto	97,42%	50,47%	51,80%
<i>Geomyces</i> spp.	84,60%	62,62%	26,00%
<i>Bacillus</i> spp.	84,06%	51,94%	38,60%

\*Proporción de incremento de degradación de TPH con nutrientes:

Formula:  $100 - (\text{sin nutrientes} \times 100 / \text{con nutrientes})$

#### 4.3 Capacidad biodegradadora de TPH de microorganismos nativos

Para todos los tratamientos se hizo un análisis microbiológico con el fin de evaluar la presencia de microorganismos nativos capaces de utilizar TPH como única fuente de carbono, para lo cual se cultivaron *in vitro* en medio de cultivo con diésel, como fuente exclusiva de carbono (ver “Materiales y Métodos”). En la Figura 12 consta la concentración inicial de bacterias y hongos nativos degradantes de TPH en el suelo natural, al tiempo cero, es decir antes del tratamiento. A estos valores se los ha considerado como patrón. Como se puede observar las concentraciones eran muy similares, especialmente de  $3,10 \times 10^5$  UFCg<sup>-1</sup> para las bacterias y de  $3,05 \times 10^5$  UFCg<sup>-1</sup> para los hongos.

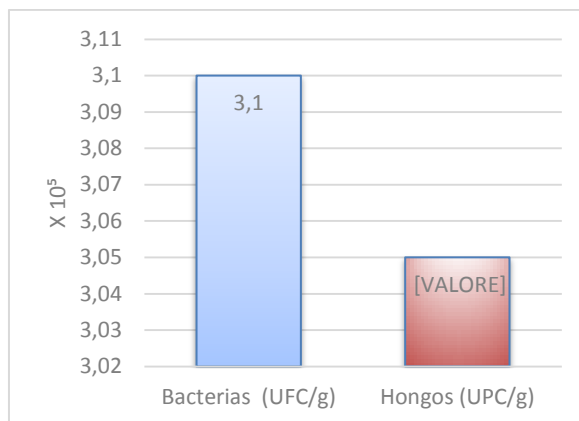


Figura 7. Concentración de bacterias y hongos nativos degradantes de TPH ( $\times 10^5$  UFCg<sup>-1</sup> y UFC/g<sup>-1</sup>) en el suelo natural, al tiempo cero (control).

Observando las Figuras 7, 8 y 9 se destaca que en todos los tratamientos hubo presencia de microorganismos degradantes de TPH.

En el tratamiento “En” se registró un aumento del doble de los hongos en los tres meses de estudio, lo cual nos sugiere que la adición de nutrientes al suelo puede haber sido el factor que favoreció su desarrollo; de hecho en los tratamientos “An” y “Ev” no se observó un aumento de concentración ni de hongos ni de bacterias (Figura 13).

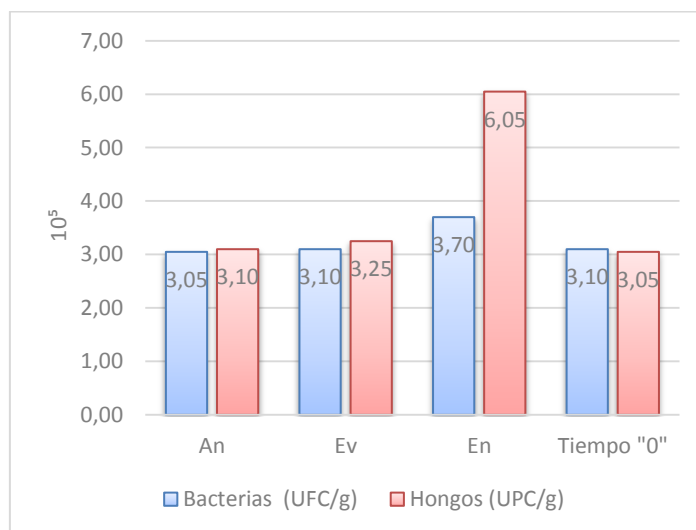


Figura 8. Concentración de bacterias degradantes TPH ( $\times 10^5$  UFCg<sup>-1</sup>) y hongos degradantes TPH ( $\times 10^5$  UFCg<sup>-1</sup>), al tiempo 0 y después de 90 días, en los tratamientos: Atenuación natural (An), Evaporación (Ev), Estimulación natural (En).

En los tratamientos de bioestimulación y de bioaumentación se ha registrado una significativa disminución de bacterias y hongos degradantes de TPH, después de 90 días (Figura 9). Este fenómeno pudo ser debido al hecho que la bioaumentación con *Bacillus* spp. y *Geomyces* spp. inhibió los microorganismos nativos, siendo ellos más eficientes en la degradación.

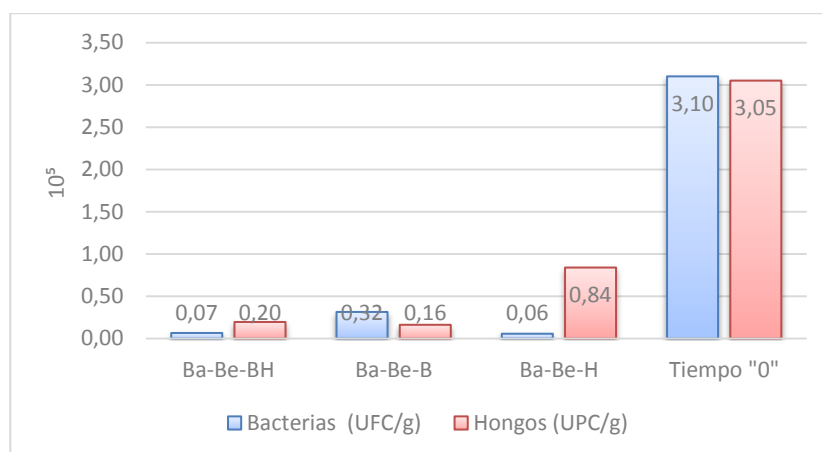


Figura 9. Concentración de bacterias degradantes TPH ( $\times 10^5$  UFCg<sup>-1</sup>) y hongos degradantes TPH ( $\times 10^5$  UPC/g), al tiempo 0 y después de 90 días, en los tratamientos: bioaumentación y bioestimulación bacterias y hongos (Ba-Be-BH), bioaumentación y bioestimulación bacterias (Ba-Be-B), bioaumentación y bioestimulación hongos (Ba-Be-H).

En la Figura 10 se observa como en los tratamientos de bioaumentación hubo un aumento general en la concentración de bacterias y hongos degradantes de TPH, después de 90 días. En todos los tres tratamientos se registró un incremento especialmente en la concentración de los hongos; de las  $3,05 \times 10^5$  UPC/g del tiempo "0" se pasó a  $4,75$ ,  $4,25$  y  $3,85 \times 10^5$  UPC/g respectivamente en los tratamientos Ba-B, Ba-BH y Ba-H. En otros estudios se ha observado que los hongos consuman más rápidamente a los hidrocarburos que las bacterias, y por ello su desarrollo fue mayor que las bacterias (Maddela *et al.*, 2016).

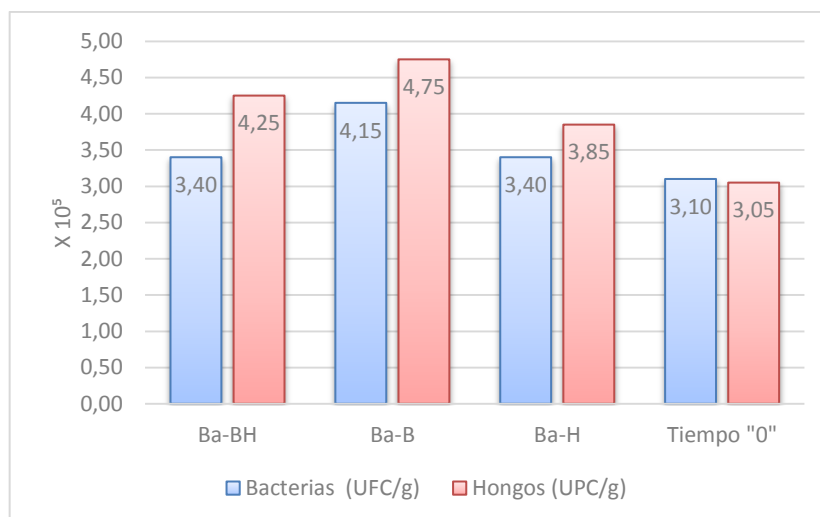


Figura 10. Concentración de hongos degradantes TPH ( $\times 10^5$  UFCg<sup>-1</sup>) y bacterias degradantes TPH ( $\times 10^5$  UFCg<sup>-1</sup>), al tiempo 0 y después de 90 días, en los tratamientos: bioaumentación bacterias y hongos (Ba-BH), bioaumentación bacterias (Ba-B), bioaumentación hongos (Ba-H).

#### 4.4 Análisis físico-químico de suelos de los tratamientos

A continuación se reportan los datos obtenidos en cuanto al análisis físico-químico de los suelos de los diferentes tratamientos. En la Tabla 6 están registrado los datos de los tratamientos “An”, “Ev” y “En”. Se observó un pH de neutro a básico, un contenido en N muy alto, en C orgánico medio y en P bajo. En cuanto a la textura todos los tratamientos fueron franco-arenosos. Comparado con los valores del “Suelo natural”, considerado como patrón, se ha observado una uniformidad de parámetros a excepción del C orgánico.

Tabla 5. Características físico-químicas del suelo de los tratamientos “An”, “Ev” y “En”

Parámetros	Repeticiones	Tratamientos			
		An	Ev	En	Sn
Humedad %		<b>10,20</b>	<b>5,60</b>	<b>41,00</b>	<b>45,50</b>
pH	R1	6,65	7,67	6,30	6,39
	R2	6,28	7,90	6,27	6,31
	R3	6,25	7,97	6,26	6,38
	Promedio	<b>6,39±0,22</b>	<b>7,85±0,1</b>	<b>6,28±0,02</b>	<b>6,36±0,0</b>
N%			<b>6</b>		<b>4</b>
	R1	0,80	1,30	1,30	0,70
	R2	1,00	1,10	1,40	0,80
	Promedio	<b>0,90±0,14</b>	<b>1,20±0,1</b>	<b>1,35±0,07</b>	<b>0,75±0,0</b>
CO%			<b>4</b>		<b>7</b>
	R1	6,60	8,20	6,00	2,70
	R2	5,50	8,60	6,60	2,90
	R3	4,70	8,40	6,60	3,30
	Promedio	<b>5,60±0,95</b>	<b>8,40±0,2</b>	<b>6,40±0,35</b>	<b>2,97±0,3</b>
P (ppm)			<b>0</b>		<b>1</b>
	R1	8,10	0,80	7,20	5,50
	R2	8,00	0,60	7,00	5,00
	Promedio	<b>8,05±0,07</b>	<b>0,70±0,1</b>	<b>7,10±0,14</b>	<b>5,25±0,3</b>
Textura %			<b>4</b>		<b>5</b>
	Arena	74	78,00	76	69,00
	Limo	20	14,00	16	18,00
	Arcilla	6	8,00	8	13,00
Clase textural		Franco	Franco	Franco	Franco
		Arenoso	arenoso	arenoso	arenoso

An=Atenuación natural; Ev=Evaporación; En=Estimulación natural; Sn=Suelo natural

Los tratamientos de bioestimulación y bioaumentación con *Bacillus* spp. y *Geomyces* spp. registraron valores de pH básicos, con valores comprendidos entre 8,05 y 8,28 (Tabla 7). Este aumento de pH probablemente fue debido al efecto alcalinizante de los compuestos derivantes de la degradación de los hidrocarburos por parte de los microorganismos arriba mencionados. El contenido en N fue muy alto, el contenido en C orgánico medio, y el contenido en P bajo. Todos los suelos de los tratamientos resultaron arenoso-franco.

Tabla 6. Características físico-químicas del suelo de los tratamientos de bioaumentación y bioestimulación.

Parámetros	Repeticiones	Tratamientos			
		Ba-Be-BH	Ba-Be-B	Ba-Be-H	Sn
Humedad %		<b>36,90</b>	<b>60,10</b>	<b>48,10</b>	<b>45,50</b>
pH	R1	8,03	8,28	6,39	8,22
	R2	8,04	8,30	6,31	8,27
	R3	8,08	8,27	6,38	8,29
	Promedio	<b>8,05±0,03</b>	<b>8,28±0,02</b>	<b>6,36±0,04</b>	<b>8,26±0,04</b>
N%	R1	1,80	1,70	0,70	1,10
	R2	2,00	1,80	0,80	1,30
	Promedio	<b>1,90±0,14</b>	<b>1,75±0,07</b>	<b>0,75±0,07</b>	<b>1,20±0,14</b>
CO%	R1	4,70	8,40	2,70	7,40
	R2	8,40	6,60	2,90	6,80
	R3	5,50	7,60	3,30	7,40
	Promedio	<b>6,20±1,95</b>	<b>7,53±0,90</b>	<b>2,97±0,31</b>	<b>7,20±0,35</b>
P (ppm)	R1	0,80	0,70	5,50	0,70
	R2	0,70	0,60	5,00	0,50
	Promedio	<b>0,75±0,07</b>	<b>0,65±0,07</b>	<b>5,25±0,35</b>	<b>0,60±0,14</b>
Textura	Arena	82,00	81,00	69,00	81,00
	Limo	9,00	12,00	18,00	14,00
	Arcilla	9,00	7,00	13,00	5,00
		Arenoso	Arenoso	Arenoso	Franco
Clase textural		franco	franco	franco	arenoso

Ba-Be-BH=bioaumentación + bioestimulación en cultivo mixto; Ba-Be-B=bioaumentación + bioestimulación con *Bacillus* spp.; Ba-Be-H=bioaumentación + bioestimulación con *Geomyces* spp.; Sn=Suelo natural.

Los tratamientos de bioaumentación con *Bacillus* spp. y *Geomyces* spp. Se registraron valores de pH básicos, con valores comprendidos entre 6,77 y 7,70 (Tabla 8). El contenido en N fue alto, el contenido en C orgánico medio, y el



contenido en P bajo. Todos los suelos de los tratamientos resultaron franco-arenoso. No se registraron cambios importantes de las variables comparado con el patrón “suelo natural”.

Tabla 7. Características físico-químicas del suelo de los tratamientos de bioaumentación

Parámetros	Repeticiones	Tratamientos			
		Ba-BH	Ba-B	Ba-H	Sn
Humedad %		<b>43,30</b>	<b>33,60</b>	<b>34,20</b>	<b>45,50</b>
pH	R1	7,68	7,00	6,81	6,39
	R2	7,72	6,93	6,74	6,31
	R3	7,70	6,97	6,77	6,38
	Promedio	<b>7,70±0,02</b>	<b>6,90±0,04</b>	<b>6,77±0,04</b>	<b>6,36±0,04</b>
N%	R1	1,00	0,70	1,00	0,70
	R2	1,10	0,80	1,10	0,80
	Promedio	<b>1,05±0,07</b>	<b>0,75±0,07</b>	<b>1,05±0,07</b>	<b>0,75±0,07</b>
CO%	R1	5,90	7,20	3,30	2,70
	R2	6,60	7,60	3,90	2,90
	R3	5,70	7,80	6,60	3,30
	Promedio	<b>6,07±0,47</b>	<b>7,53±0,31</b>	<b>4,60±1,76</b>	<b>2,97±0,31</b>
	R1	0,70	0,60	0,60	5,50
P (ppm)	R2	0,50	0,60	0,70	5,00
	Promedio	<b>0,60±0,14</b>	<b>0,60±0,00</b>	<b>0,65±0,07</b>	<b>5,25±0,35</b>
Textura %	Arena	73,00	67,00	67,00	69,00
	Limo	18,00	26,00	22,00	18,00
	Arcilla	9,00	7,00	11,00	13,00
		Franco	Franco	Franco	Franco
Clase textural		arenoso	arenoso	arenoso	arenoso

Ba-BH=bioaumentación en cultivo mixto; Ba-B= bioaumentación con *Bacillus* spp.; BaH=bioaumentación con *Geomyces* spp.; Sn=Suelo natural

## 5. CONCLUSIONES

La investigación realizada ha llevado a las siguientes conclusiones:

La adición de nutrientes orgánicos (compost, aserrín) e inorgánicos (N, P, K y arena) en las muestras de suelo, contaminado de forma artificial con petróleo, ha determinado una mejora en la degradación de TPH, tanto por parte de los microorganismos nativos como por parte de los microorganismos conocidos (*Bacillus* spp. y *Geomyces* spp.).

Los tratamientos que tuvieron mejores resultados en cuanto a la degradación de TPH fueron bioaumentación y bioestimulación con *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis* y *Geomyces pannorum*, *Geomyces* sp. (Ba-Be-BH), bioaumentación y bioestimulación *Geomyces pannorum*, *Geomyces* sp. (Ba-Be-H) y bioaumentación y bioestimulación *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis* (Ba-Be-B), que registraron valores residuales de TPH de 322, 1.925 y 1.993 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente; los mismos que dieron un porcentaje de degradación de 97,42% (Ba-Be-BH), 84,60% (Ba-Be-H) y 84,06% (Ba-Be-B).

En todos los tratamientos hubo presencia de microorganismos nativos con capacidad de degradar TPH. Especialmente se observó que los hongos consuman más rápidamente a los hidrocarburos que las bacterias, y por ello su desarrollo fue mayor que las bacterias.

## 6. RECOMENDACIONES

Realizar estudios en condiciones de laboratorio *in situ* para validar los resultados obtenidos de los microorganismos seleccionados *Geomyces pannorum*, *Geomyces* sp. y con las bacterias *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis*.

Identificar molecularmente los microorganismos nativos con capacidad degradadora de TPH y efectuar experimentos previos en laboratorio.

Realizar la difusión de los resultados obtenidos al fin de informar a los actores involucrados en la biorremediación de suelos contaminados, sobre las potencialidades de aplicación de los microorganismos seleccionados (*Geomyces* spp. y *Bacillus* spp.) así como de los nativos.

## 7. RESUMEN

En la presente investigación se realizó un estudio sobre la biorremediación *in vivo* de muestras de suelo contaminado de forma artificial con petróleo, con la finalidad de evaluar la capacidad degradadora de hidrocarburos totales (TPH) de microorganismos nativos y seleccionados, así como el efecto de nutrientes orgánicos e inorgánicos sobre dicha capacidad. Se implementaron 9 tratamientos de bioaumentación (Ba), bioestimulación (Be) y se incluyó uno de suelo natural como patrón; se adicionó un 5% de petróleo a los tratamientos. El estudio duró 90 días, después de los cuales se realizaron los análisis gas-cromatográficos para determinar la eventual presencia de TPH residuales ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) y también se realizaron los análisis microbiológicos, en medio de sales mínimos, para evaluar la presencia de microorganismos nativos degradantes de TPH, mediante la adición de diésel como única fuente de carbono. El tratamiento que dio el mejor resultado fue el Ba-Be-BH, es decir el cultivo mixto de hongos *Geomyces pannorum*, *Geomyces* sp. y de bacterias *Bacillus cereus* y *B. thuringiensis*. Los TPH residuales fueron de 322 mg/kg correspondiente a una degradación de hidrocarburos del 97,42%. En cuanto a los microorganismos degradantes de TPH se observó que todos han tenido microorganismos capaces de degradar TPH, aunque los que dieron el mejor resultados fueron los de bioaumentación. Los resultados obtenidos permiten afirmar que los microorganismos seleccionados (*G. pannorum*, *Geomyces* sp., *B. cereus* y *B. thuringiensis*) son buenos candidatos para la biorremediación en campo, puesto que han obtenido buenos resultados preliminares tanto *in vitro* como *in vivo* con muestras de suelo contaminadas de forma artificial.

## 8. ABSTRACT

In this research, studies on *in vivo* bioremediation on oil artificially contaminated soil samples were performed, in order to assess the degradative capacity of total hydrocarbons (TPH) of native and selected microorganisms; the effect of organic and inorganic nutrients was also performed. Nine treatments on bioaugmentation (Ba) and biostimulation (Be) were implemented, as well as the natural soil treatment, considered as pattern; 5% oil was added to treatments. The study lasted 90 days, after which the gas-chromatographic analyzes were performed to determine the possible presence of TPH residual (mg/kg) and microbiological analyzes were also performed, in minimal salts medium by adding diesel as the sole carbon source, to assess the presence of natives microorganisms degrading TPH. The treatment which gave the best result was Ba-Be-BH, the mixed culture of fungi *Geomyces pannorum*, *Geomyces* sp. and bacteria *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis*. Residual TPHs were 322 mg/kg corresponding to a degradation rate of 97.42%. Additionally, TPH degrading microorganisms were observed in all treatments, but those that gave the best results were the bioaugmentation ones. The results confirm that the selected microorganisms (*G. pannorum*, *Geomyces* sp., *B. cereus* and *B. thuringiensis*) are good candidates for field bioremediation, since preliminary results have been successful both *in vitro* and *in vivo*.

## 9. BIBLIOGRAFIA

Almeida, A. (2006). Fases e impactos de la actividad petrolera en: Manuales de Monitoreo Ambiental Comunitario. Acción Ecológica. Quito.

Álvaro, C.E.S., Martínez, A.M. & Arocena, L.A. (2014). Estudio comparativo del agregado de enmiendas orgánicas e inorgánicas en procesos de biorremediación de suelos norpatagónicos contaminados con petróleo. Rev. Soc. Quimi. Perú. 80 (4): 251-261

Atlas R.M. & Utermann, R. (1999). Bioremediation. In: Demain AL & Davies JE (Eds) Manual of Industrial Microbiology 2ND ed (pp 666-681), ASM Press, Washington D.C.

Benavides, L. J., Quintero, G. & Ostos, O. (2006). Aislamiento e identificación de diez bacterias des nitrificantes a partir de un suelo agrícola contaminado con abonos nitrogenados proveniente de una finca productora de cebolla. Nova Publicación Científica 4 (006): 50-54

Ciric, L., Philip, J. / Whiteley A.S. (2010). Hydrocarbon utilization within a diesel-degrading bacterial consortium. FEMS Microbiology Letters 116ç122  
El-Attar, H & Jackson, M.L. (1973). Montmorillonite soils developed in Nile river sediments. Soil Science 116: 191-201

García, M.G., Infante, C. & López, L. (2012). Biodegradación de un crudo mediano en suelos de diferente textura con y sin agente estructurante. Bioagro 24 (2): 93-102

Hidalgo, D., Navas, S., Estrella, B. & Apolo, P. (2008). Bacterias nativas degradadoras de hidrocarburos en las provincias de Orellana y Sucumbios para su uso en procesos de biorremediación de suelos contaminados. Laboratorio de Ciencias Biotecnológicas. Área de Desarrollo Biotecnológico. Unidad de

Tecnologías Ambientales. Vicepresidencia Corporativa de Ambiental, Responsabilidad Social, Seguridad y Salud de PETROECUADOR.

Johsen, A., Winding, A., Karlson & Roslev, P. (2002). Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of C13-labeled cell lipids. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6106-6113

King, R. B., Long, G. M. & Sheldon, J. K. (1997). *Practical environmental bioremediation. The field guide.* Lewis publishers, NY

Lu, L., Pielke, R.A., Liston, G.E., Parton, W.J., Olima, D. & Hartman, M. (1999). Implementation of a two-way interactive atmospheric and ecological model and its application to the central United States. *Journal of Climate* 14

Maddela, N., Burgos, R., Kadiyala, V., Riofrio, A. & Bangeppagari, M. (2016). Renoval of crude oil from soil by using novel microorganisms of Ecuador soils: solid and slurry phase methods. *International Biodeterioration & Biodegradation* 108: 85-90

Montero, C. (2013). Estudio *in vitro* de las propiedades biodegradadoras de hidrocarburos, por parte de hongos aislados de suelos contaminados por petróleo. TESIS DE GRADO – Universidad Estatal Amazónica

Muskus Morales, A. M., Santoyo Muños, C. & Plata Quinteros, L.S. (2013). Evaluación de las técnicas de atenuación natural, bioventing, bioaumentación y bioaumentación-bioventing, para la biodegradación de diésel en un suelo arenoso, en experimentos en columna. *Revista Gestión y Ambiente*, 16 (2): 83-94

Nelson, D.W., Sommers, L.E. (1996). Total carbón, organic carbón, and organic matter. *Methods of soil analysis. Part 3 - Chemical methods.* pp.961-1010

Pernía, B., Demey, J.R., Inojosa, Y. & Naranjo Briceño, L. (2012). Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclastico de hongos aislados de crudo y sus derivados: Un meta-análisis. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Agal.* 3 (1):1-39

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

Rosenberg, E. y Ron, E. Z. (1996). Bioremediation of petroleum contamination. In: Crawford RL & Crawford DL (Eds) *Bioremediation. Principles and Applications* (pp 100-124). Biotechnology Research Series 6. University Press, Cambridge.

Thomas, G.W. (1996). Soil pH and soil acidity In: *Methods of soil analysis. Part 3-chemical methods*. pp.475-490

Tirado Torres, S., Acevedo Sandoval, O., Romo Gomes, C., Marmolejo Santillán, Y. & Gayosso Canales, M. (2015). Participación de consorcios microbianos en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. *Revista Iberoamericana de ciencias* ISSN 2334-2501. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo Pachuca de Soto. Hidalgo México.

Torres, K. & Zuluaga, T. (2009). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Tesis Universidad Nacional de Colombia. Medellín

Walter, M.V. (1997). Bioaugmentation. In: Hust, CJ (Ed) *Manual of Environmental Microbiology* (pp 753-765). ASM Press, Washington, D.C.

Valle, A. (2013). Análisis y evaluación de la biodegradación de petróleo crudo, a nivel de laboratorio mediante bacterias nativas aisladas de suelos de la provincia de sucumbíos, cantón Lago Agrio, Ecuador. Noviembre- 27. TESIS DE GRADO - ESPE.

[www.juiciocrudo.com/articulo/petroecuador-24-anos-de...y.../1131](http://www.juiciocrudo.com/articulo/petroecuador-24-anos-de...y.../1131) 17/04/(2014). Desde 1990, Petroecuador ha expandido sus operaciones en la región ... En este



período, la estatal *petrolera* *derramó* al menos 129.656 barriles de ... ilegítima contra Chevron, empresa que nunca ha operado en *Ecuador*.

Zobell, C. E. (1946). Marine Microbiology, a monograph on hydrobacteriology. Chronica Botanics Company, Waltham Massachusset, USA