



Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE BIORREMEDIACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS DE
LA BASE COCA TRIBOILGAS PARA ELIMINACIÓN DE HAP's y TPH

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

INGENIERO AMBIENTAL

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

AMBIENTE Y BIODIVERSIDAD

SUBLINEA:

AUTOR: ESTEFANIA MISHEL MORENO DUARTE

ASESOR: MSc. SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE

Ibarra, 05 julio de 2024

Ibarra, 05 julio de 2024

MSc. Santiago Xavier Mafla Andrade
ASESOR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigente en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Ibarra (PUCEI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.



(f).....

MSc. Santiago Xavier Mafla Andrade
C.C.: 1002658399

PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Ibarra (PUCEI):



(f).....

MSc. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C.: 1002658399



(f).....

PhD. Yadira Fernanda Ordoñez Vivanco

C.C.: 1103764864



(f).....

MSc. Moraima Cristina Mera Aguas

C.C.: 1001743721

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo Estefania Mishel Moreno Duarte, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 de Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derecho de disponer de sus derechos o autorizar de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, 05 julio de 2024

f): *Estefania Moreno*

Estefania Mishel Moreno Duarte

C.C.: 1002951620

AUTORÍA

Yo, Estefania Mishel Moreno Duarte, portador de la cédula de ciudadanía N° 1002951620, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del autor, y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.

f): *Estefania Moreno*

Estefania Mishel Moreno Duarte

C.C.: 1002951620

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Estefania Mishel Moreno Duarte, con C.C.: 1002951620, autor del trabajo de grado intitulado: EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE BIORREMEDIACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS DE LA BASE COCA TRIBOILGAS PARA ELIMINACIÓN DE HAP's Y TPH, previo a la obtención del título profesional de Ingeniera Ambiental, en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCEI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, 05 julio de 2024

f): *Estefania Moreno*

Estefania Mishel Moreno Duarte

C.C.: 1002951620

**DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO EN LA ELABORACIÓN,
DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación de Proyecto de Titulación: EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE BIORREMEDIACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS DE LA BASE COCA TRIBOILGAS PARA ELIMINACIÓN DE HAP's Y TPH, lo propuesto en el Código de Ética de la investigación y el aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, aprobado por el Consejo Superior de la PUCE con fecha 13 de febrero de 2023

Para constancia firma:

f): Estefania Moreno

Estefania Mishel Moreno Duarte

Estudiante que ejecuta el trabajo de Titulación

C.C/ Pasaporte: 1002951620

Carrera: Ingeniería Ambiental

Ibarra, 15 de febrero de 2023

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada con mucho amor a mis padres Lourdes y Francisco. No hay palabras suficientes para agradecerles todo lo que han hecho por mí. Gracias por su amor incondicional, paciencia, apoyo y sacrificio para hacer posible este sueño. Ustedes son los pilares de mi vida y esta tesis es su logro tanto como el mío.

A mi hermano Santiago ha sido mi compañero inseparable y mi más leal apoyo. Desde nuestra infancia, has estado a mi lado, animándome y creyendo en mí incluso cuando yo misma dudaba. Tu amor incondicional y tu inquebrantable confianza en mí han sido el pilar fundamental que me ha sostenido a lo largo de este arduo pero gratificante camino académico.

A mi novio Ronald compañero de vida. Tu apoyo incondicional, paciencia y animo han sido fundamentales para alcanzar esta meta. Gracias por estar a mi lado en los buenos y malos momentos de este camino.

Estefania Mishel Moreno Duarte

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a Dios por brindarme la sabiduría, fortaleza, salud y perseverancia necesaria para culminar esta etapa académica.

Gracias, mamá y papá, por creer en mí, por impulsarme a ser mejor y por estar siempre a mi lado. Los amo profundamente y espero que este logro sea una muestra de mi eterna gratitud hacia ustedes.

Agradezco a mi tía Lucia a mis primos Alexander y Maite, su presencia en mi vida ha sido una bendición. Nuestras risas, nuestras conversaciones y nuestros momentos de complicidad han sido un bálsamo para mi alma, brindándome la fuerza y la determinación necesaria para perseverar este camino.

Quiero expresar mi más profunda gratitud a mi tutor el MSc. Santiago Mafla, por su guía certera, sus enseñanzas y por la confianza depositada en mi para culminar con éxito este proyecto. Sin su respaldo, este logro no hubiera sido posible.

Deseo expresar mi agradecimiento a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Ibarra, quien me abrió las puertas para poder culminar mi carrera.

De igual manera a la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales, por acogerme y dejarme cumplir mis sueños. A los docentes de la carrera de ingeniería Ambiental quienes con sus conocimientos hicieron que logre crecer día a día como profesional, gracias a cada uno de ustedes por su paciencia.

Mi más sincero agradecimiento a la empresa Triboilgas por permitirme realizar mi trabajo de titulación en tan prestigiosa empresa.

Estefania Mishel Moreno Duarte

ÍNDICE

DEDICATORIA	vii
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
RESUMEN	15
ABSTRACT	16
CAPÍTULO I	17
INTRODUCCIÓN	17
CAPÍTULO II	19
OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo general	19
2.2. Objetivos específicos	19
2.3. Hipótesis	19
CAPÍTULO III	20
ESTADO DEL ARTE	20
3.1. Historia del Petróleo en el Ecuador	20
3.1.1. El Petróleo	20
3.2. Contaminación de suelos por hidrocarburos	21
3.3. Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos	21
3.4. Tipos de biorremediación	22
3.4.1. Biorremediación in situ	22
3.4.2. Biorremediación ex situ	23

3.5. Ventajas y desventajas de la biorremediación	23
3.6. Hidrocarburos totales del petróleo (TPH)	24
3.6.1. Efectos ambientales causados por los TPH	24
3.7. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)	25
3.7.1. Efectos ambientales causados por los HAPs	25
3.8. Bioestimulación	26
3.9. Bioaumentación	26
3.10. Microorganismos benéficos remediadores de HAPs y TPH (<i>Pseudomonas</i> , <i>Aeromonas</i> , producción de biosurfactantes)	27
3.11. Nitrógeno, fósforo y potasio (NPK)	27
CAPÍTULO IV	29
MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1. Materiales, equipos, insumos y reactivos	29
4.2. Métodos	30
4.2.1. Localización geográfica	30
4.2.1.1 Mapa de ubicación de lugar de muestreo	32
4.2.2. Toma de muestra del suelo contaminado	33
4.3. Análisis fisicoquímicos	33
4.3.1. pH y conductividad eléctrica	33
4.3.2. Textura	33
4.3.3. Materia orgánica	34
4.3.4. Nitrógeno Kjeldahl total (N)	34
4.3.5. Fósforo (P)	34
4.3.6. Potasio (K)	35
4.3.7. Preparación de muestras para los tratamientos	35

4.4. Bioestimulación y Bioaumentación (Remediación) de TPH y HAPs	36
4.4.1. TPH	36
4.4.2. HAP's	36
4.5. Diseño experimental	37
4.6. Variables	37
4.7. Análisis estadístico	38
CAPÍTULO V	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
5.1. Caracterización fisicoquímica	39
5.2. Biorremediación de HAP's y TPH	39
5.3. Análisis estadístico de TPH	52
5.4. Análisis estadístico de HAP's	55
5.5. Discusión	59
CAPÍTULO VI	60
CONCLUSIONES	60
CAPÍTULO VII	62
RECOMENDACIONES	62
CAPÍTULO VIII	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos	38
Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del suelo	39
Tabla 3. Resultados de pH	40
Tabla 4. Resultados de Conductividad eléctrica	41
Tabla 5. Resultados de Materia orgánica	43
Tabla 6. Resultados de Nitrógeno Kjeldahl total	44
Tabla 7. Resultados de Fósforo	45
Tabla 8. Resultados de Potasio	47
Tabla 9. Resultados de TPH	48
Tabla 10. Resultados de HAP's Bioestimulación	49
Tabla 11. Resultados de HAP's Bioaumentación	51
Tabla 12. Resultados de HAP's Testigo	52
Tabla 13. Resultado de TPH	53
Tabla 14. Análisis estadístico de TPH para los tratamientos a los 7, 14 y 21 días.	53
Tabla 15. Análisis estadístico ANOVA	54
Tabla 16. Prueba de TUKEY 5%	55
Tabla 17. Resultado de HAP's	56
Tabla 18. Análisis estadístico de HAP's para los tratamientos a los 7, 14 y 21 días.	56
Tabla 19. Análisis estadístico ANOVA	58
Tabla 20. Prueba de TUKEY 5%	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Variación de pH con los tratamientos	40
Figura 2	Variación de conductividad eléctrica con los tratamientos	42
Figura 3	Variación de materia orgánica con los tratamientos	43
Figura 4	Variación de nitrógeno Kjeldahl total con los tratamientos	45
Figura 5	Variación de fósforo con los tratamientos	46
Figura 6	Variación de potasio con los tratamientos	47
Figura 7	Variación de TPH con los tratamientos	49
Figura 8	Variación de HAP's con el tratamiento de bioestimulación	50
Figura 9	Variación de HAP's con el tratamiento de Bioaumentación	51
Figura 10	Variación de HAP's con los tratamientos testigo	52
Figura 11	Análisis estadístico boxplot TPH	54
Figura 12	Análisis estadístico boxplot HAP's	57

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Registro fotográfico	69
Anexo 2. Picos estándar HAP's con tiempos de retención para curva de calibración	70
Anexo 3. Picos de la curva de calibración estándar HAP's	71
Anexo 4. Análisis de los tratamientos	77
Anexo 5. Resultado de HAP's	78

RESUMEN

La extracción de hidrocarburos en la Amazonía ecuatoriana ha provocado contaminación del suelo. En la base de la empresa Triboilgas no existe un sistema de tratamiento, por lo que es necesario evaluar dos métodos de biorremediación en suelos contaminados de la base Triboilgas para remediación de HAPs y TPH. La biorremediación ha ganado importancia como una alternativa para recuperar la calidad de los suelos contaminados, diversas investigaciones han evidenciado que esta técnica permite remover altos porcentajes de contaminantes, especialmente en suelos de textura arcillosa, cumpliendo con la normativa del acuerdo ministerial 097A criterios de remediación. Los ensayos realizados con los métodos de bioestimulación, bioaumentación y el testigo han logrado disminuir considerablemente los niveles de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) presentes en el suelo contaminado. Los resultados de TPH muestran que para la bioestimulación se reduce un 99,75% (0,18 mg/kg), la bioaumentación reduce un 91,24% (6,44 mg/kg) y finalmente el testigo con un 79,28% (15,21 mg/kg) de remediación, dando como resultado el mejor tratamiento de bioestimulación, todos los tratamientos se encuentran dentro de los parámetros de la normativa del acuerdo ministerial 097A. Para los HAP'S de acuerdo con los tratamientos se tiene los siguientes datos, la bioestimulación reduce en un 43,62% (2549,07), la bioaumentación en un 61,46% (1558,24) y finalmente el testigo con una reducción del 82,65% (784,19) siendo el más efectivo para reducir concentraciones de HAP's y biorremediar el suelo. Se puede mencionar que los tratamientos uno y dos reducen los HAP's en bajas proporciones, debido a la complejidad del 2-Metilnaftaleno requiere un proceso de mayor tiempo o con bacterias que sean especializadas para este tipo de hidrocarburos aromáticos, que posiblemente no se encontraban en los tratamientos anteriormente mencionados.

Palabras clave: Biorremediación, bioestimulación, bioaumentación, HAP's y TPH.

ABSTRACT

Hydrocarbon extraction in the Ecuadorian Amazon has caused soil contamination. There is no treatment system at the Triboilgas company base, so it is necessary to evaluate two bioremediation methods in contaminated soils at the Triboilgas base for remediation of PAHs and TPH. Bioremediation has gained importance as an alternative to recover the quality of contaminated soils. Several investigations have shown that this technique allows the removal of high percentages of contaminants, especially in clay-textured soils, complying with the regulations of ministerial agreement 097A remediation criteria. The tests carried out with the biostimulation, bioaugmentation and control methods have achieved a considerable reduction in the levels of total petroleum hydrocarbons (TPH) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) present in the contaminated soil. The TPH results show that biostimulation reduces 99,75% (0,18 mg/kg), bioaugmentation reduces 91,24% (6,44 mg/kg) and finally the control with 79,28% (15,21 mg/kg) of remediation, resulting in the best biostimulation treatment, all treatments are within the parameters of the regulations of the ministerial agreement 097A. For PAHs, according to the treatments, the following data are obtained: biostimulation reduces 43,62% (2549,07 mg/kg), bioaugmentation 61,46% (1558,24 mg/kg) and finally the control with a reduction of 82,65% (784,19 mg/kg) being the most effective in reducing PAHs concentrations and bioremediating the soil. It can be mentioned that treatments one and two reduce PAHs in low proportions, due to the complexity of 2-methylnaphthalene it requires a longer process or with bacteria that are specialized for this type of aromatic hydrocarbons, which were possibly not found in the previously mentioned treatments.

Keywords: Bioremediation, biostimulation, bioaugmentation, HAP's y TPH.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de petróleos ligeros de muy buena calidad ha sido una carga muy importante para el desarrollo ambiental de la Amazonia ecuatoriana. El problema de las operaciones de hidrocarburos comienza con el grave impacto al medio ambiente en cada etapa de la operación, afectando principalmente al suelo por la contaminación de los inevitables vertidos en la zona.

En la actualidad la base de la Empresa Triboilgas, ubicada en la provincia de Orellana, en la ciudad de El Coca kilómetro 7 vía a Lago Agrio, no cuenta con un sistema de tratamiento de suelos, posteriormente a su contaminación por los hidrocarburos extraídos en la zona, por lo cual es necesario realizar un estudio de métodos de biorremediación para los sustratos sólidos y semisólidos.

La contaminación ambiental ocasionada por hidrocarburos se reconoce como uno de los más graves problemas de la actualidad, sobre todo cuando se asocia a los derrames accidentales a gran escala. “Después de ocurrido el derrame la mayoría de los compuestos alifáticos se pierden por volatilización, mientras que algunos hidrocarburos como los policíclicos persisten en la superficie” (Riojas, et al., 2010).

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 contaminantes presentes y las propiedades físico-químicas del suelo (Donoso & Valladolid, 2023). Para elegir un método de biorremediación se debe tener en cuenta el tipo de contaminante que se desea remediar, las propiedades del suelo y por último la existencia de microorganismos degradadores del contaminante que se trate de remediar (Riojas, et al., 2010).

El principal interés de este trabajo de investigación es encontrar métodos de biorremediación para poder aportar al cuidado del medio ambiente y la amplia biodiversidad que tiene el Ecuador, la cual mediante procesos de biorremediación de los suelos contaminados por hidrocarburos precisamente en TPH's (Hidrocarburos Totales del Petróleo) y HAP's (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos), se dio una solución a la biorremediación a la problemática de contaminación del recurso suelo.

Por lo antes expuesto, el propósito fundamental del presente proyecto fue ejecutar la biorremediación, para que la base Coca de Triboilgas pueda tener una mejor manejabilidad ambiental de acuerdo con las extracciones de sustratos que realizan y así evitar la contaminación por acumulación de hidrocarburos en el suelo.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar dos métodos de biorremediación en suelos contaminados de la base Triboilgas para remediación de HAPs y TPH.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar la caracterización fisicoquímica de los sustratos procedentes de la extracción de hidrocarburos de la base coca de Triboilgas, mediante ensayos de laboratorio para el proceso de biorremediación.
- Determinar la reducción de HAPs y TPH mediante la aplicación de bioestimulación y bioaumentación en sustratos solidos de la extracción de hidrocarburos de la base coca de Triboilgas.

2.3. Hipótesis

Hipótesis alternativa

Mediante el uso de la biorremediación se reduce la concentración de HAPs y TPH.

Hipótesis nula

Mediante el uso de la biorremediación no se reduce la concentración de HAPs y TPH.

CAPÍTULO III

ESTADO DEL ARTE

3.1. Historia del Petróleo en el Ecuador

La historia de la explotación hidrocarburífera en Ecuador comienza en el año 1878, específicamente en la Provincia de Santa Elena, donde se empezó a realizar las primeras investigaciones para identificar si existía presencia de crudo en ese yacimiento, posteriormente después de casi 33 años se da inicio a los distintos procesos extractivos, en ese mismo año ocurre la perforación del primer pozo ecuatoriano en la Península de Santa Elena, al cual se lo llamo ANCON 1. Posteriormente en 1919 se funda en Londres la empresa ANGLOU ECUADORIAN OIILDFIELDS LIMITED, quien será encargada de procesos de exploración en la península de Santa Elena. Al término del año 1961 la empresa ANGLOU, afirma que los yacimientos de la Península se encuentran agotados y que ya no son rentables. Posterior a esto en los años 1967 ocurre la exploración petrolera en la Amazonia, con el primer pozo llamado LAGO AGRÍO 1 de la compañía TEXACO GULF, produciendo 2700 barriles diarios, dando inicio así al bum petrolero ecuatoriano (Siguenza, 2007).

El auge de las exportaciones petroleras, a partir de la década de 1970, fue un eje importante en la historia de la economía ecuatoriana, sobre todo porque estuvo acompañado por un aumento de los precios internacionales del crudo. Todo ello condujo a transformar el desarrollo económico ecuatoriano, centrado hasta entonces en un modelo agroexportador. Pero una economía basada en el petróleo también haría sentir sus efectos. En las décadas de 1980 y 1990, la caída de los precios del petróleo significo varios impactos negativos en la economía del país. (Chamorro, et al., 2013, p.8).

3.1.1. El Petróleo

Según investigaciones realizadas el petróleo está formado por una mezcla de hidrocarburos, así como lo señala la siguiente investigación:

El Petróleo es un recurso natural no renovable, que se forma por la degradación anaerobia de los componentes orgánicos por largos periodos de tiempo y determinadas condiciones ambientales, está formado por una mezcla de varios hidrocarburos (parafínicos, aromáticos y naftalénicos). La

composición de crudo es: Carbono 83-87%, Hidrógeno: 11-14%, Oxígeno: 0-1%, Azufre: 0,2-5%, Nitrógeno: 0-5% y otros componentes en menor cantidad; estas proporciones varía según el yacimiento de donde se extrae el petróleo y la cantidad de grados API (medida de densidad). El grado API es la unidad de medida americana para representar la densidad del petróleo y sus derivados, precisa cuan liviano o pesado es el petróleo (Gavilánez, 2013, p.41-42).

3.2. Contaminación de suelos por hidrocarburos

El suelo contaminado con hidrocarburos se refiere a la presencia no deseada y en concentraciones significativas de compuestos orgánicos de hidrogeno y carbono (hidrocarburos) en el suelo, generalmente como resultado de derrames petroleros, fugas de combustibles o desechos industriales (Donoso & Valladolid, 2023).

La presencia de elementos o sustancias que perjudican la vida biológica de un ecosistema se considera contaminación del suelo. Puede dañar la función y sostenibilidad del sistema, vinculada con la cantidad de hidrocarburos vertidos de manera accidental en el suelo (Lara, 2022).

Los hidrocarburos derivados del petróleo representan una fuente contaminante del medio ambiente como resultado de la actividad humana. En contacto con el suelo los hidrocarburos causan un efecto negativo provocando una alteración física y química que afecta a la biodiversidad, eliminando el crecimiento de plantas. La sinergia del contaminante puede alcanzar las capas freáticas, contaminando así las fuentes de agua subterráneas utilizadas para el consumo humano y agrícola (Donoso & Valladolid, 2023).

3.3. Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos

La biorremediación implica emplear microorganismos como plantas, hongos y bacterias, ya sean naturales o genéticamente alterados, con el fin de eliminar sustancias tóxicas al transformarlas en compuestos menos dañinos o inofensivos para el medio ambiente y la salud humana (Benavides, et al., 2006).

La efectividad de la biorremediación se basa principalmente en la acción de microorganismos que necesitan oxígeno para prosperar, lo que implica la necesidad de garantizar una oxigenación adecuada del suelo (Iturbe, et al., 2001).

Según López, et al., (2006), en el suelo, la presencia de hidrocarburos obstaculiza la transferencia de gases con la atmosfera, desencadenando una serie de procesos fisicoquímicos simultáneos como

la evaporación y la infiltración. Le velocidad de estos procesos, así como su toxicidad, salinidad y dificultad de tratamiento, varían según el tipo de hidrocarburo, la temperatura, la humedad, la textura del suelo y la cantidad derramada.

El termino biorremediación se emplea para referirse a diversos métodos que hacen uso de seres vivos como plantas, hongos, bacterias, entre otros, para eliminar (extraer), descomponer (biodegradar) o cambiar (biotransformar) sustancias orgánicas dañinas en productos metabólicos menos nocivos o inofensivos (Velasco & Volke, 2003).

La investigación de Trujillo & Ramírez (2012), mencionan que la biorremediación en suelos se utiliza para combatir o eliminar agentes contaminantes específicos presentes en el suelo, mediante la degradación o conversión de compuestos nocivos en otros menos tóxicos o en materia orgánica en descomposición. Estos procesos de degradación y transformación son comunes en la naturaleza, y al manipular adecuadamente los sistemas biológicos involucrados, es posible acelerar la velocidad de cambio o descomposición de manera efectiva.

3.4. Tipos de biorremediación

En la investigación de Lujan (2019), existen dos tipos de biorremediación; *in situ* que consiste en el tratamiento de aguas, suelos o arenas contaminadas sin extraerlas del lugar en el que se encuentran, utilizando (bioaumentación: haciendo uso de microorganismos vivos al lugar contaminado o la bioestimulación, agregando nutrientes al mismo suelo y la atenuación natural referida a una remediación pasiva que dependerá de los procesos naturales para degradar los contaminantes del suelo y el agua subterránea), en tanto, la biorremediación *ex situ* es aquella donde el proceso se lleva a cabo excavando el lugar, usando biorreactores y compostaje. Por ello, la biorremediación *in situ* es un proceso que resulta eficaz, a la hora de tratar suelos contaminados con hidrocarburos.

Los tipos de biorremediación son los siguientes: *in situ*, *ex situ*.

3.4.1. Biorremediación in situ

Las estrategias *in situ* se enfocan en promover y generar condiciones propicias para el desarrollo de microorganismos a partir de sustancias contaminantes. Para alcanzar este propósito, comúnmente se recurre a la introducción de aire u oxígeno (bioventeno),

nutrientes (bioestimulación), microorganismos (bioaumentación) y/o humedad, junto con la regulación de la temperatura y el pH (Lara, 2022).

3.4.2. Biorremediación *ex situ*

Los métodos de biorremediación *ex situ* abarcan: a) técnicas de biodegradación en fase líquida, donde el suelo se combina con agua para crear un lodo junto con microorganismos y nutrientes; b) procesos de biodegradación en fase sólida, donde los suelos se disponen en una celda de tratamiento (compostaje) o sobre membranas impermeables (biobalanza), añadiendo agua y nutrientes (Lara, 2022).

3.5. Ventajas y desventajas de la biorremediación

Entre las ventajas de la biorremediación se incluyen su accesibilidad, su aplicabilidad directa en el entorno a tratar, su impacto ambiental reducido en comparación con la descomposición de contaminantes, y la eliminación de los costos de transporte al llevarse a cabo en el lugar. Además, puede combinarse con otras tecnologías para mejorar el tratamiento de contaminantes (Jiménez & Getsemani, 2021).

Una ventaja adicional que es la utilización de materiales renovables (residuos y subproductos) que ha impulsado la biorremediación en diversos entornos contaminados, se relaciona con el empleo de recursos como caña de azúcar, pulpa de café, aserrín y viruta (Garzón, et al., 2017).

Tecnologías alternativas presentan posibles beneficios en comparación con los métodos convencionales, como costos reducidos, menor intrusión en el sitio contaminado, mayor respeto al medio ambiente en cuanto a sus productos finales y la necesidad mínima o nula de tratamientos posteriores (Petro & Mercado, 2014).

Según Jiménez & Getsemani (2021), mencionan las desventajas que se destaca es ciertos componentes clorados o metales pesados muestran resistencia a la degradación biológica. Además, en el proceso de degradación microbiana, existe la posibilidad de generar compuestos aún más peligrosos que los contaminantes originales a tratar.

Garzón, et al. (2017), menciona que se ha observado que la gestión de plantas fitorremediadoras no ha sido adecuadamente estudiada ni desde un punto de vista científico ni técnico en relación con su ciclo de vida. Por lo tanto, no se puede asegurar que el empleo de plantas bioacumuladoras

pueda resultar en la dispersión de contaminantes al medio ambiente a través del ciclo del carbono, ni en su distribución a lo largo de la cadena trófica.

En entornos donde se requiere una limpieza rápida debido a consideraciones económicas, políticas o ambientales, la biorremediación puede no ser viable, ya que en ocasiones los procesos biológicos pueden ser más lentos en comparación con otras técnicas de limpieza (Ruiz, 2019).

3.6. Hidrocarburos totales del petróleo (TPH)

Los TPH consisten en compuestos de carbono e hidrógeno que tienen baja o nula solubilidad en agua. Estos compuestos presentan cadenas que varían de 5 a 36 átomos, compartiendo propiedades químicas similares. Se clasifican según su densidad, punto de ebullición, presión de vapor, solubilidad y polaridad. Debido a la mínima diferencia de electronegatividad entre los enlaces carbono-hidrógeno, estos compuestos son considerados no polares en su estructura (Cevallos & García, 2018).

Los TPH son una mezcla de hidrocarburos compuestos por hidrógeno y carbono. Se clasifican en fracciones de hidrocarburos de petróleo que presentan comportamientos similares en el suelo o el agua estas fracciones contienen una variedad de productos químicos individuales, como hexano, aceites minerales, benceno, tolueno, xilenos, naftalina y fluoreno, junto con otros productos derivados del petróleo y componentes de la gasolina. Las muestras de TPH pueden contener algunas de estas sustancias o una combinación de ellas (Castro, 2007).

3.6.1. Efectos ambientales causados por los TPH

Las propiedades fisicoquímicas de los TPH que afectan al medio ambiente contienen hidrocarburos de cadena larga como parafinas, naftenos, olefinas y compuestos aromáticos, que ingresan al suelo principalmente durante operaciones relacionadas con el petróleo y sus derivados (Guevara, 2016). Los hidrocarburos totales del petróleo pueden afectar negativamente las especies acuáticas, causando asfixia e intoxicación por su acumulación en la membrana celular, lo que altera las propiedades fisicoquímicas y fisiológicas de esta, así mismo, los componentes de petróleo crudo ligero pueden ser tóxicos para las plantas debido a que se absorben fácilmente y causan daño a nivel celular (Avila, Bersano & Fillmann, 2010).

3.7. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)

Los hidrocarburos aromáticos polinucleares, o policíclicos, se originan principalmente en recursos naturales como el petróleo, el carbón y depósitos de alquitrán, resultantes de la descomposición de materia orgánica, así como de la descomposición parcial de combustibles fósiles o de biomasa. Estos compuestos han generado inquietud como contaminantes debido a que ciertas sustancias han sido clasificadas como carcinógenas, mutagénicas y teratógenas (Pila, et al., 2022).

Según el estudio de Ortiz, et al. (2011), manifiesta que: las propiedades físicas y químicas de los HAPs que pueden ser candidatos para una mejor dispersión a través de la atmosfera son las de bajo peso molecular. Los compuestos se encuentran de forma natural en el medio ambiente, pero también pueden ser producidas como compuestos individuales para efectos de investigación. Los HAPs se clasifican según su origen en: Biogénico, Petrogénico y Perogénico.

- **Biogénicos** son compuestos de productos metabólicos de organismos microscópicos donde se observa que aportan al suelo Haftaleno y Perileno.
- **Petrogénicos** son derivados del petróleo con compuestos homólogos alquilados, ingresan al ambiente de forma gaseosa.
- **Pirogénicos** son productos de combustibles de material orgánico: hidrocarburos y carbón mineral.

Estos compuestos orgánicos derivados de los combustibles, donde contienen al menos dos anillos aromáticos. Los HAPs emitidos a la atmósfera por diversas actividades antrópicas de manera gaseosa o partículas a través de corrientes de aire que favorece su dispersión al ambiente.

3.7.1. Efectos ambientales causados por los HAPs

Los HAPs son conocidos por causar un gran efecto negativo en el ambiente ya que son tóxicos para el ecosistema. Son sustancias que fácilmente se transportan en el aire dependiendo de las propiedades.

Las empresas dedicadas a extraer y transportar el petróleo generan una gran contaminación de HAPs al medio ambiente, los estudios realizados en los seres humanos demuestran que las personas expuestas a través de la respiración o el contacto de la piel durante largos períodos de tiempo con mezclas que contienen HAPs y otros compuestos también pueden contraer cáncer (ATSDR, 2016).

3.8. Bioestimulación

Este proceso implica alterar el ambiente para activar las bacterias presentes con capacidad de biorremediación. Esto se logra mediante la adición de nutrientes esenciales y aceptores de electrones, como fósforo, nitrógeno, oxígeno o carbono (por ejemplo, melaza), que en condiciones normales estarían en cantidades limitadas y podrían restringir la actividad microbiana (Godleads, et al., 2015).

El proceso de bioestimulación, se provee elementos como nutrientes y electrones que son escasos, lo que impulsa la actividad metabólica y el crecimiento de los microorganismos degradadores. Esta acción incrementa la velocidad de biodegradación cuando las condiciones ambientales son adecuadas (Vallejo, Salgado & Roldan, 2005).

Bioestimulación, ampliamente utilizada para disminuir la presencia de contaminantes, implica estimular la actividad microbiana natural mediante la aplicación de soluciones que contienen nutrientes, oxígeno y electrones en suelos contaminados con hidrocarburos (Gómez, et al., 2009).

3.9. Bioaumentación

Desde los años 70, la bioaumentación ha sido considerada como una alternativa para la biorremediación de áreas contaminadas por hidrocarburos, consiste en la introducción de microorganismos degradadores del petróleo para completar las poblaciones naturales presentes en el entorno (Godleads, et al., 2015).

La evaluación de la bioaumentación en suelos contaminados implica realizar pruebas de laboratorio que incluyan la caracterización de las poblaciones microbianas, identificación de microorganismos capaces de colonizar y degradar los contaminantes presentes en el suelo Gómez. et al., (2009).

Es un proceso natural que aprovecha bacterias, hongos y plantas para degradar contaminantes, ya que estos organismos pueden utilizar los contaminantes orgánicos como fuente de energía en sus procesos metabólicos, transformándolos en productos menos tóxicos (Licta, 2020).

3.10. Microorganismos benéficos remediadores de HAPs y TPH (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, producción de biosurfactantes)

Según la investigación de Vanzetto & Thomé (2022), las bacterias de *Pseudomonas* no están adaptadas a ambientes con un pH inferior a 4,5, y su temperatura óptima de crecimiento está entre 4°C y 42°C para la degradación de los hidrocarburos. Por tanto, la temperatura tiene una influencia

importante, ya que el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos son función de este cambio de temperatura. El rango de crecimiento de este género bacteriano es de 10°C a 45°C, y la actividad de crecimiento microbiano se duplica cada 10°C, lo que lo convierte en el rango óptimo para procesos de biorremediación (Muñoz & Pacheco, 2017).

Con el artículo publicado por Castillo, More & Cornejo (2020), menciona que a parte de la *Pseudomona* hay otra bacteria que muestra potencial para la biorremediación de HAPs y TPHs es *Aeromonas hydrophila*, cuentan con enzimas y maquinaria metabólica que les permite utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono y energía, contribuyendo así a eliminarlos del medio ambiente.

Según la investigación de Rakowska (2020), las condiciones de operación de la bacteria *Pseudomonas* son muy importantes para entender su biología y función, especialmente a la hora de reparar suelos con contaminación de hidrocarburos y sus derivados.

En la investigación de Castillo, More & Cornejo (2020), menciona que además de estas bacterias, también es importante destacar el papel de los biosurfactantes en el proceso de biorremediación.

Los biosurfactantes son moléculas producidas por algunos microorganismos, como bacterias y hongos, que reducen la tensión superficial entre el agua y los contaminantes hidrofóbicos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos y los hidrocarburos totales del petróleo. Esto facilita la dispersión y disolución de los contaminantes, aumentando su disponibilidad para la acción de los microorganismos degradantes.

3.11. Nitrógeno, fósforo y potasio (NPK)

Los microorganismos que descomponen los hidrocarburos en una biorremediación utilizan estos compuestos como su fuente de carbono de energía, Aunque los contaminantes y los compuestos orgánicos presentes en el suelo suelen proporcionar este carbono necesario, también se requieren nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo y potasio, que a veces pueden estar en cantidades limitadas en comparación con el carbono disponible (Iturbe, et al., 2001).

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales, equipos, insumos y reactivos

4.1.1. Materiales

- Crisoles
- Tubos de ensayo
- Papel filtro
- Equipo de protección personal (EPP)
- Frascos ambar 1000ml
- Frascos ámbar de plástico 100 ml
- Micropipetas
- Cooler
- Pala
- Guantes
- Jeringas de insulina
- Filtros de 0.20 micras (μm) (CHROMAFIL Xtra)
- Melaza
- Suelo nativo de la laguna de Mojanda
- Agua destilada estéril

4.1.2. Equipos

- Estufa (Mettler)
- Autoclave (ican CLAVE)
- Horno mufla (Thermo SCIENTIFIC)
- Cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC (Jasco)
- Infrarrojo (Jaco FT/IR-6200)
- Potenciómetro (LAQUA)
- Conductímetro (HANNA)
- Balanza analítica (ADAM)
- Espectrofotómetro de absorción atómica marca (SensAA GBC)

- Espectrofotómetro (Thermo Spectrnic)
- Tamiz
- Agitador magnético

4.1.3. Reactivos

- Agar LB (LAB A Neogen Company)
- Acetonitrile 1% (FisherChemical)
- Diclorometano (Fisher Chemical)
- Estándar HAP's (Restek)
- Ácido sulfúrico (Fisher Chemical)
- Peróxido de hidrogeno (Fisher Chemical)
- Pastilla catalizadora
- Hidróxido de sodio al 35% (Fisher Chemical)
- Ácido bórico al 4% (Fisher Chemical)
- Rojo tashiro
- Ácido clorhídrico (Merk)
- Acido ascórbico
- Molibdato de amonio
- Tartrato de amonio y potasio (Mallinckrodt)

4.2. Métodos

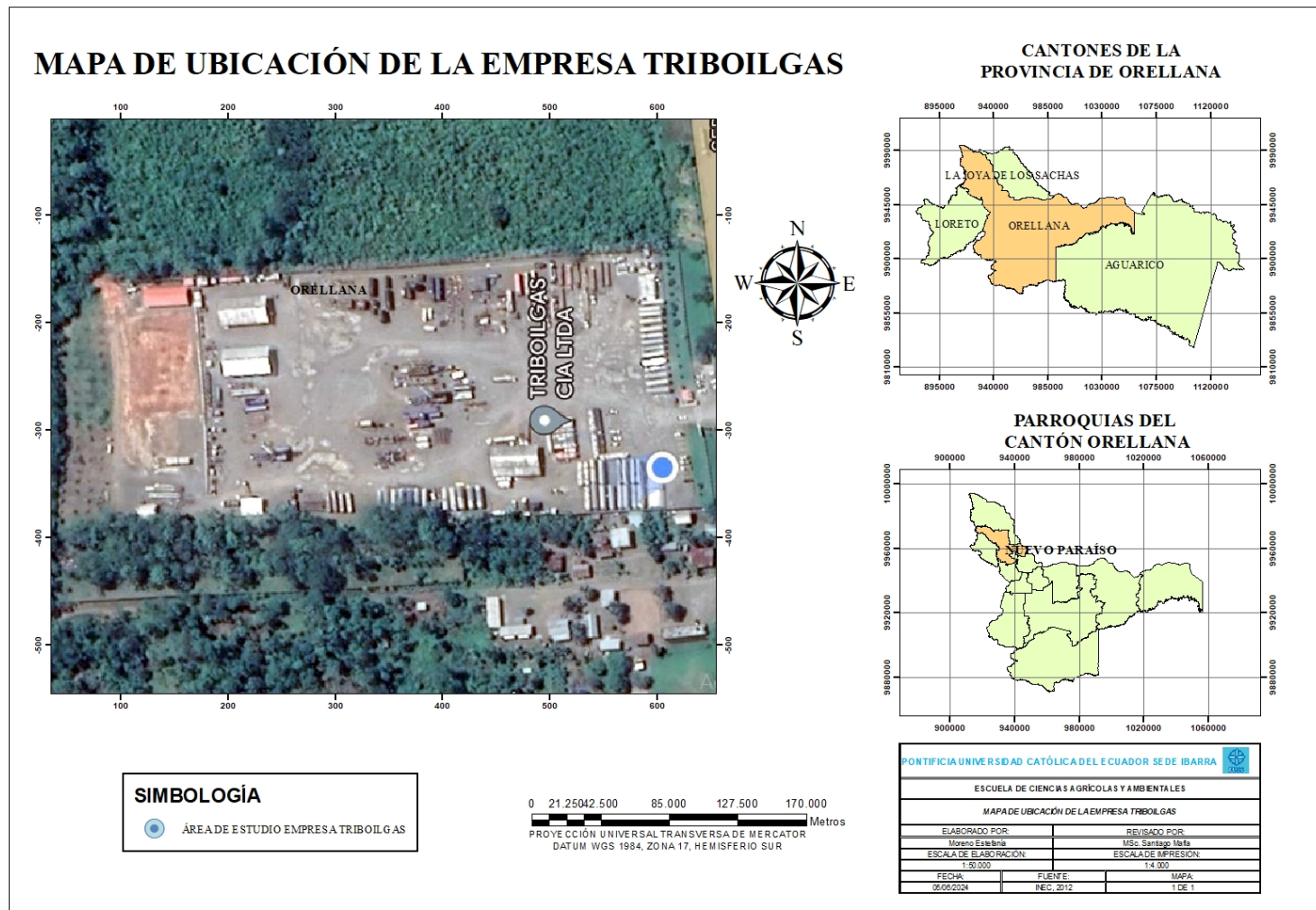
Esta investigación es analítica y experimental, se la desarrollo en dos fases; fase de campo, y fase laboratorio. La primera fase se llevó a cabo en la ciudad de El Coca ubicada en la provincia de Orellana, en la empresa Triboilgas donde se obtuvieron las muestras contaminadas de suelo. La segunda fase se realizó en los laboratorios: Química, Microbiología, Química Analítica y Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Ibarra.

4.2.1. Localización geográfica

Triboilgas Cia. Ltda. es una empresa ecuatoriana, que brinda servicios de reacondicionamiento, perforación y pistoneo de pozos petroleros, cumpliendo estándares de calidad dentro de la industria Hidrocarburífera, trabajando de manera óptima tanto como empresas privadas como estatales, dicha empresa se encuentra localizada en las siguientes coordenadas 0°24'05''S 76°59'45''W

ubicada en la provincia de Orellana, en la ciudad de El Coca, en el kilómetro 7 vía Lago agrio. El estudio de las muestras de suelo contaminado se llevó a cabo en los laboratorios Química Analítica y Biotecnología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales, ubicado en la ciudad de Ibarra, en la provincia de Imbabura.

4.2.1.1 Mapa de ubicación de lugar de muestreo



4.2.2. Toma de muestra del suelo contaminado

Para realizar la caracterización fisicoquímica de los sustratos procedentes de la extracción hidrocarburos se procedió a tomar las muestras del suelo contaminado que se encontraba acumulado en las celdas de desechos, después se tamizó las muestras debido a que se encontraba con material de los tanques, se procedió a pesar 1 kilo en cada frasco ámbar, una vez que ya se obtuvo la cantidad se colocó en el cooler para poder ser trasladadas hasta la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Ibarra, una vez ya en la universidad se empezó a analizar los parámetros fisicoquímicos iniciales como: textura, pH, conductividad, Nitrógeno, Potasio, fósforo, materia orgánica, los mismos parámetros se analizaron una vez culminados los tratamientos del diseño experimental (Peña & Castillo, 2015)

4.3. Análisis fisicoquímicos

Las muestras recientes de suelo contaminado fueron homogenizadas para poder realizar todos los análisis correspondientes, al inicio, durante los tratamientos y al finalizar.

4.3.1. pH y conductividad eléctrica

El análisis de pH se realizó bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, se pesó 10 gramos de suelo contaminado más 50 ml de agua siendo una proporción equitativa, es decir una relación de 1:5. Esta mezcla se colocó en agitación durante 20 minutos para después proceder a medir con el potenciómetro de marca HORIBA, modelo LAQUA. Seguido de esto y la conductividad eléctrica con la norma TS ISO 11265 con el conductímetro. Después con la misma muestra se realizó el análisis de conductividad eléctrica con la norma TS ISO 11265, utilizando el conductímetro modelo HANNA HI 8733 (Ramírez, Vargas, & Arroyave, 2020)

4.3.2. Textura

Se coloca 100 gramos de suelo seco, el tamizaje de la muestra se realizó con tres tamices siendo estos el N°30 = 600UM, N°40 = 425 UM y N°50 = 300UM, se procedió a mover los tamices para que el suelo sea tamizado en cada uno, luego se pesó el contenido de muestra en cada tamiz, una

vez realizado todo esto se usó el triángulo de textura para determinar el tipo de suelo a partir del porcentaje tamizado en los tamices de 30-40-50 (Andrades, Moliner, & Masaguer, 2015).

4.3.3. *Materia orgánica*

El análisis de materia orgánica se realizó con la NORMA NTC 5403. Se siguió el protocolo de (Izquierdo & Arévalo, 2021) se procede a pesar una cápsula de porcelana (crisol) posterior se pesa 10 gramos de suelo contaminado y se duplica el procedimiento en la otra cápsula, se coloca a secar en el horno durante unas 2 horas a 105°. La masa de la muestra se pesa con exactitud, a continuación, se lleva la muestra a 550°C durante 4 horas, y se pesa la masa de la muestra después de la calcinación.

4.3.4. *Nitrógeno Kjeldahl total (N)*

El análisis de la muestra se realizó con el método Kjeldahl, se pesó 2 gramos de la muestra de suelo contaminado a la cual se adiciona 12 mililitros de ácido sulfúrico, se adicionó 3.3 mililitros de peróxido de hidrógeno se le colocó una pastilla catalizadora, después se colocó a digerir de 2 a 3 horas una vez que ya está digerida la muestra se procedió a la neutralización en la cual se necesita hidróxido de sodio al 35%, después se colocó 50 mililitros de agua destilada y 50 mililitros de solución de hidróxido de sodio al 35%, para la titulación se realizó una solución al 4% de ácido bórico se colocó 50 mililitros de ácido bórico al 4% se le añadió 2 o 3 gotas de rojo tashiro y se procedió a titular en el equipo de destilación de nitrógeno Kjeldahl total y esto se procedió a la titulación con ácido clorhídrico al 0.2 normal (Reagents, 2017).

4.3.5. *Fósforo (P)*

La muestra se llevó bajo el análisis del método ácido ascórbico, se pesó 2 gramos de la muestra después se manda a digerir, posterior se aforo la muestra en un balón afora de 100 ml se realizó una disolución de 4 gramos de molibdato de amonio, 0,27432 gramos de tartrato de amonio y potasio y 1,76 gramos de ácido ascórbico, se mezcla el tartrato de amonio y potasio con el ácido ascórbico para producir una mezcla e ir adicionando el molibdato de amonio para que se dé una reacción azul posterior a eso se tomó 5 ml de la muestra para colocar en las celdas y proceder a leer en el espectrofotómetro (Lasso , 2007).

4.3.6. Potasio (K)

El análisis de las muestras se realizó bajo los métodos oficiales de la AOAC (38) y la USP 39 (31) por absorción atómica, se pesó 2 gramos para proceder a dejar secar la muestra durante un día, la muestra se colocó a digestar la muestra con agua regia en los crisoles con una relación de ácido nítrico 3ml y ácido clorhídrico 1ml, se procedió después a calentar en la estufa a 80° dejando por 24 horas, después de este tiempo se filtró y se aforar la muestra después se llevó a leer la muestra en el equipo de Espectrofotómetro de absorción atómica marca (SensAA GBC) (Pérez & Esquivel, 2018).

4.3.7. Preparación de muestras para los tratamientos

4.3.7.1. Bioestimulación

Se procedió a pesar 500 gramos del suelo contaminado con petróleo, después se colocó en las bandejas para poder colocar cada repetición, para el crecimiento de bacterias se colocó 100ml de melaza y 900 ml de agua destilada en un frasco en el autoclave a esterilizar durante una hora, se coloca la después se deja enfriar para proceder a rosear en los tratamientos para conservarlos con una humedad del 80% para la biorremediación. El control de la humedad se lo llevo durante 21 días para que esta humedad no baje del 80% (Suarez, 2013).

4.3.7.2. Bioaumentación

Se procedió a pesar 500 gramos del suelo contaminado con petróleo, después se colocó en las bandejas para poder colocar cada repetición, después se utilizó 50 g suelo nativo de Mojanda para crecimiento de nutrientes, se procedió a pesar 5 g de agar LB, y 200 ml de agua destilada y se colocó a autoclavar por una hora. Después se dejó enfriar y se puso a agitar durante 20 minutos para después dejar durante 24 horas en la incubadora, y finalmente se filtra la preparación para proceder a rosear en los tratamientos para conservar con una humedad del 80% para la biorremediación. El control de la humedad se lo llevo durante 21 días para que esta humedad no baje del 80% (Suarez, 2013).

4.3.7.3. Testigo

Se procedió a pesar 500 gramos del suelo contaminado con petróleo, después se colocó en las bandejas para poder colocar cada repetición, para el testigo se colocó en un frasco boeco 1000 ml de agua destilada y se envió a la autoclave durante una hora, después se dejó enfriar para proceder

a rosear en los tratamientos para conservarlos con una humedad del 80% para la biorremediación. El control de la humedad se lo llevo durante 21 días para que esta humedad no baje del 80% (Suarez, 2013).

4.4. Bioestimulación y Bioaumentación (Remediación) de TPH y HAPs

Se procede a realizar los diferentes tratamientos para la biorremediación de TPH (Hidrocarburos Totales del Petróleo) y HAP's (Hidrocarburos Aromáticos policíclicos) en suelos contaminados con melaza, suelo nativo y agua.

4.4.1. TPH

Se realizó mediante Espectroscopia Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR) con los métodos D5369-93-3540C y 3541 de la US EPA, mediante la cuantificación de los hidrocarburos totales de petróleo se realizó usando la curva de calibración , después se pesó 10 gramos de suelo contaminado más 10 mililitros de diclorometano se le agito por 20 minutos a 400 rpm se dejó decantando por unos 30 minutos después se procedió a filtrar con discos de 0.20 micras, posterior se toma 0.3 mililitros del filtrado y se coloca en la celda PIKE TECHNOLOGIES para proceder a leer en infrarrojo (Martínez, Morales, & Alor, 2016).

4.4.2. HAP's

Se realizó la caracterización de HAP's mediante la Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) mediante el método EPHA, inyectando una solución del estándar. Luego se buscaron las condiciones instrumentales óptimas para obtener el mejor cromatograma para los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos.

La caracterización de hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante HPLC se llevó a cabo utilizando una solución de 1 ml del estándar de HAP's y 50 ml de acetonitrilo, para esto se fue variando las condiciones de la temperatura y la composición, con el fin de encontrar las condiciones óptimas que permitan una buena separación de los analitos, de esta manera poder sacar la curva de calibración de todos los analitos y poder identificar sus tiempos de retención y su altura (Cevallos & García , 2018).

Para la lectura de los tratamientos se pesó 1 gramos de cada muestra se realizó después una disolución con diclorometano se agito por unos 3 minutos se procedió a extraer con jeringa de 5 ml

la disolución, la cual se filtró con un disco de 0.20 μm , de la muestra filtrada se tomó 0.100 ml para aforar a 5 ml de acetonitrilo y se inyectó 20 μm .

Condiciones del equipo

- Detector: HPLC
- Longitud de onda: 230 nanómetros
- T° de la columna; 25°C
- Composición: 80 acetonitrilo y 20 agua

4.5. Diseño experimental

Las unidades experimentales se realizaron con un diseño completamente al azar. Por consiguiente, se desarrolló tres tipos de tratamientos, de los cuales se tomó 500 gramos para la realización de cada uno de ellos. El tratamiento uno se realizó por bioestimulación con melaza, la cual consistió en reducir la concentración de contaminantes del suelo mediante la estimulación de microorganismos a través de nutrientes, la cual acelera la tasa de biodegradación. El tratamiento dos se realizó por bioaumentación, con suelo nativo de la laguna de Mojanda que se trata de adicionar microorganismos con altas capacidades de biodegradar el suelo contaminado. El tratamiento tres con agua, siendo el testigo, consistió en colocar agua en el suelo contaminado, el cual removerá los contaminantes para ser extraídos y proceder a la depuración de los mismo.

Se realizó los análisis de las muestras compuestas de cada uno de los tratamientos a los 7, 14 y 21 días, adicional se analizó cual de estos tratamientos se redujo más rápido.

4.6. Variables

4.6.1. *Variable/s Independiente/s*

- Tratamiento por bioestimulación
- Tratamiento por bioaumentación
- Tratamiento con agua

4.6.2. *Variable/s dependiente/s*

- Concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's)
- Hidrocarburos totales de petróleo (TPH)

Tabla 1*Tratamientos*

Tratamientos	Descripción
T1	Suelo contaminado con hidrocarburos más nutrientes.
T2	Suelo contaminado con hidrocarburos más bacterias.
T3	Suelo contaminado con hidrocarburos más agua (testigo).

4.7. Análisis estadístico

Con los resultados que se obtuvo a partir del diseño experimental, se utilizó el programa IBM SPSS Statistics versión 25 año 2017, licencia gratuita, para el ANOVA con una prueba de Tukey al 5%, N°. de unidades experimentales: 9 total.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización fisicoquímica

Para la caracterización físico química inicial se realizaron los análisis de suelo: pH conductividad, textura, materia orgánica, nitrógeno, fósforo, potasio (NPK), TPH, HAP's para lo cual se obtuvo los siguientes resultados:

Valores iniciales

Tabla 2

Caracterización fisicoquímica del suelo

Parámetro Fisicoquímico	Unidades	Resultados	1Normativa 097/A
Textura		Franco arcillo arenoso	**
pH		6,24	6 a 8
Conductividad	μS/cm	171,00	400,00
Materia orgánica	%	6,20	**
Nitrógeno Kjeldahl total	%	0,06	**
Fósforo	mg/kg	482,13	**
Potasio	mg/kg	520,00	**
TPH	mg/kg	73,45	620,00
HAP's	mg/kg	4521,10	0.1

1: La normativa con la que se comparo es el acuerdo ministerial 097A.

De acuerdo a los datos físico químicos obtenidos de una muestra inicial del suelo contaminado se puede observar los siguientes resultados: el parámetro físico dándonos una textura franco arcillo arenoso, los parámetros químicos como el pH 6.24, conductividad 171.00 micro siemens por centímetro, materia orgánica 6.20%, nitrógeno Kjeldahl total 0.06%, fósforo 428.13 mg/kg, potasio 520.00 mg/kg, TPH 73.45 mg/kg, HAP's 4521,10 mg/kg.

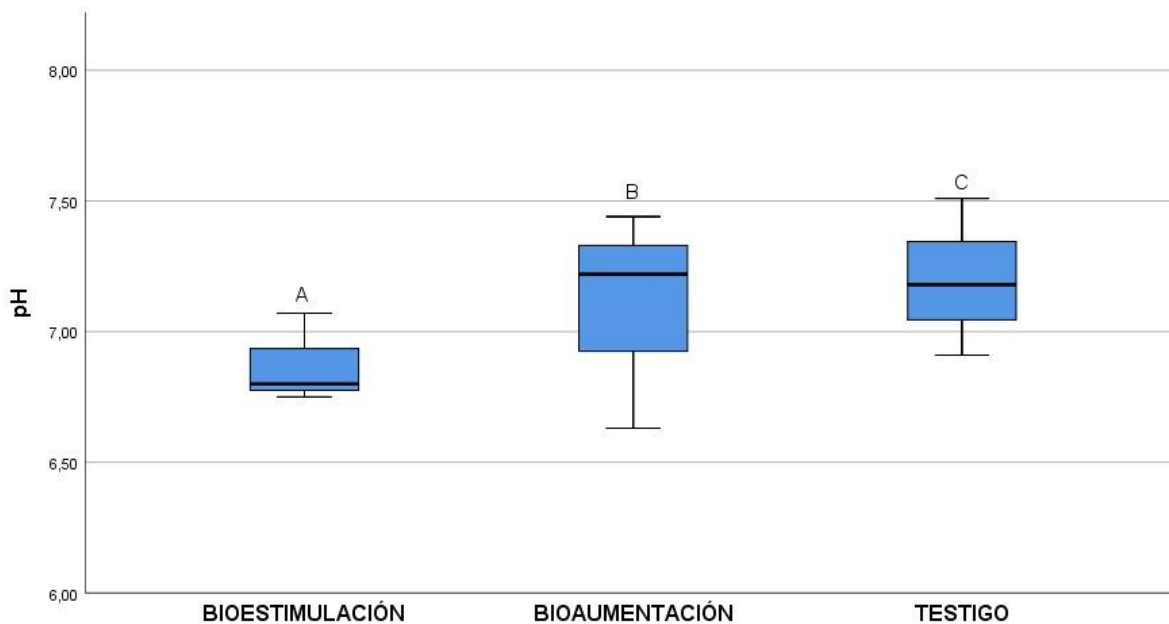
5.2. Biorremediación de HAP's y TPH

Posterior se realizaron tres tipos de tratamientos bioestimulación (melaza), bioaumentación (suelo nativo de Mojanda) y testigo (agua), a los 7, 14 y 21 días.

Tabla 3*Resultados de pH*

Tiempo	Bioestimulación	Bioaumentación	Testigo
7 días	7,07	7,44	7,51
14 días	6,75	6,63	6,91
21 días	6,80	7,22	7,18

En la tabla 3 muestra los resultados del pH tomados a los 7, 14 y 21 días de los tratamientos A, B y C. El menor resultado de pH a los 7 días es en A con 7,07, seguido de B con 7,44 y por último C con 7,51. Para los 14 días el pH arroja el menor resultado en B con 6,63, seguido de A con 6,75 y por último el C con 6,91. Finalmente, el pH a los 21 días muestra los siguientes resultados A con 6,80, seguido del C con 7,18, y la B con 7,22.

Figura 1*Variación de pH con los tratamientos*

Nota. La figura 1 representa la variación de pH a los 7, 14 y 21 de los tratamientos A, B y C, obteniendo como resultado una variación para los tres tratamientos que se encuentran dentro del rango de 6,5 a 7,5 en presencia de hidrocarburos (petróleo).

En la investigación de Martínez & López (2001), menciona que “la variación para los parámetros de pH, contra los factores de concentración y tipo de hidrocarburos se tienen una diferencia ($P < 0.05$) en suelos sometidos a contaminación a dosis de 100 a 150 000 mg/kg, en biorremediación se requiere un rango de pH de 6 a 8” (p.14).

De acuerdo con la investigación AL-Awadhi (2002), los suelos contaminados por derrames de petróleo tienen una biorremediación donde disminuye el pH pasando de valores neutros a ligeramente ácidos 7 a 5.

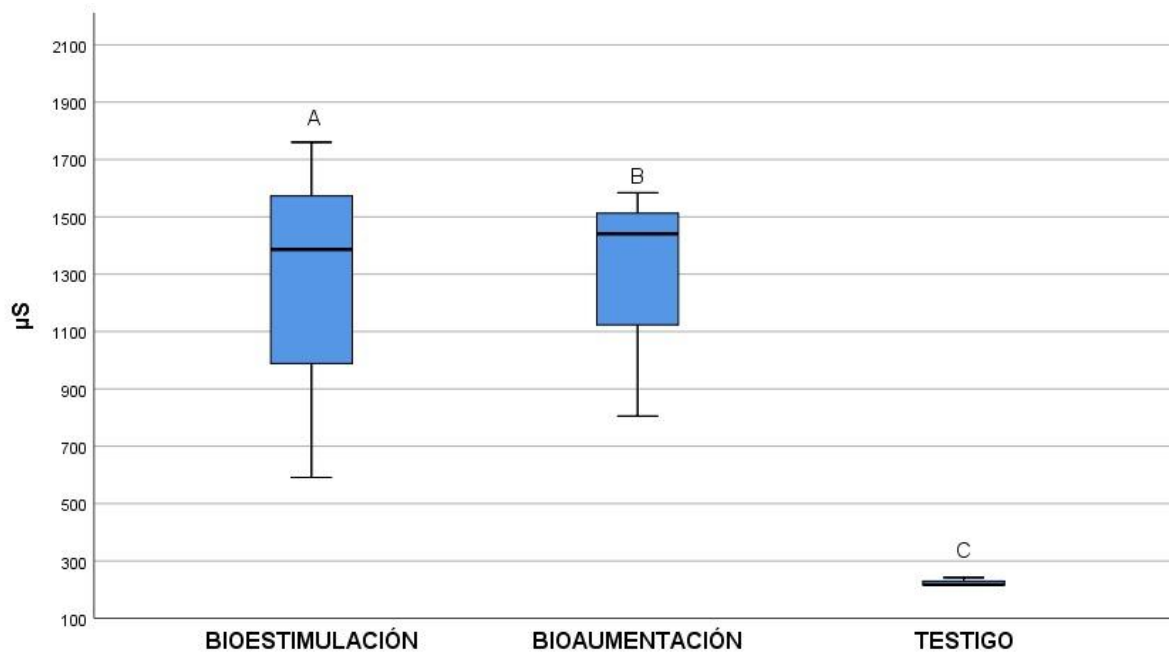
Todos los resultados que muestra la figura 1 se encuentran dentro del rango establecido de 6 a 8 para los días 7, 14 y 21, y como resultados finales el suelo es ligeramente ácido en la A, y neutro para la B y C a los 21 días.

Tabla 4

Resultados de Conductividad eléctrica

Tiempo	Bioestimulación ($\mu\text{S/cm}$)	Bioaumentación ($\mu\text{S/cm}$)	Testigo ($\mu\text{S/cm}$)
7 días	591	805	217
14 días	1386	1441	242
21 días	1760	1584	216

En la tabla 4 muestra los resultados de conductividad tomados a los 7, 14 y 21 días de los tratamientos A, B y C. El menor resultado de conductividad a los 7 días en C con 217 $\mu\text{S/cm}$, seguido de A con 591 $\mu\text{S/cm}$ y por último la B con 804 $\mu\text{S/cm}$. Para los 14 días la conductividad arroja el menor resultado en C con 242 $\mu\text{S/cm}$, seguido de A con 1386 $\mu\text{S/cm}$ y por último B con 1441 $\mu\text{S/cm}$. Finalmente, la conductividad a los 21 días muestra los siguientes resultados C con 216 $\mu\text{S/cm}$, seguido de B con 1584 $\mu\text{S/cm}$, y A con 1760 $\mu\text{S/cm}$.

Figura 2*Variación de conductividad eléctrica con los tratamientos*

Nota. La figura 2 representa la conductividad en valores para 7, 14 y 21 días correspondiente a tres tratamientos A, B y C, teniendo una variación considerable en C con valores cercanos a 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$, B con valores cercanos a 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y A con valores aproximados a 1700 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

En el acuerdo ministerial 097A (MAE, 2015) se evidencia que en la tabla 2 de criterios de remediación los valores máximos permisibles en la conductividad eléctrica para el uso de suelos industriales son de 400 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

La biorremediación del suelo a los 21 días se encuentra dentro de los parámetros en el tratamiento C con 216 $\mu\text{S}/\text{cm}$, A y B sobrepasan los valores máximos permisibles por la acidez del suelo.

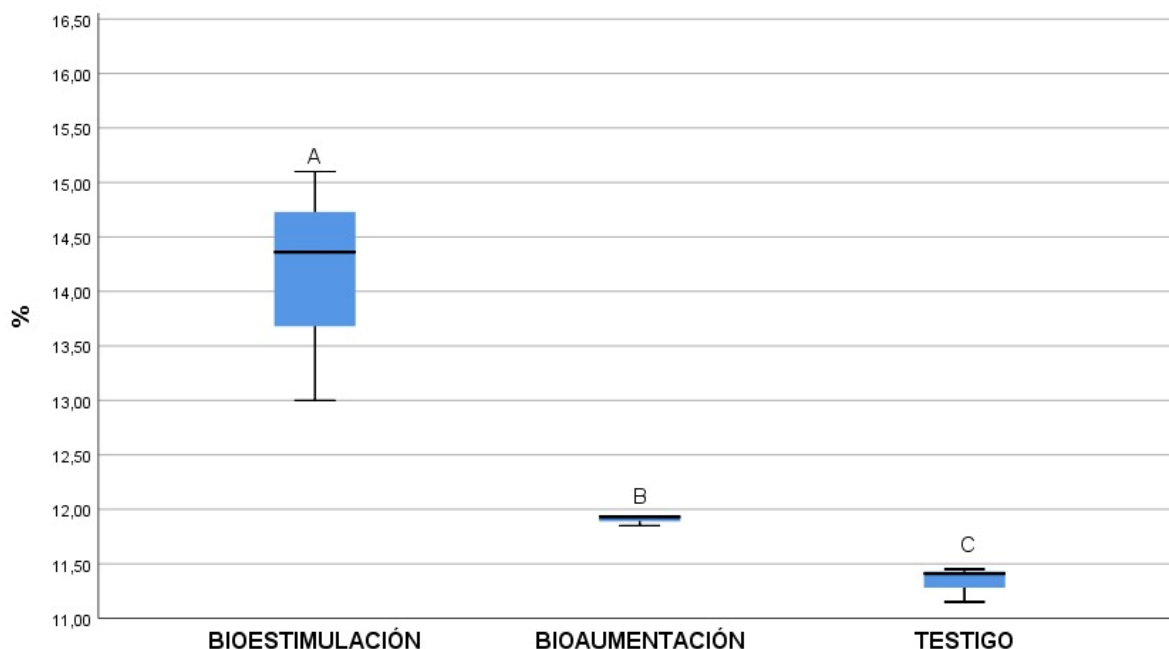
Tabla 5*Resultados de Materia orgánica*

Tiempo	Bioestimulación	Bioaumentación	Testigo
7 días	13,00	11,85	11,15
14 días	14,36	11,93	11,45
21 días	15,10	11,94	11,41

En la tabla 5 muestra los resultados de materia orgánica a los 7, 14 y 21 días de los tratamientos A, B y C. El menor resultado de materia orgánica a los 7 días es en C con 11,145 %, seguido de B con 11,847 % y por último A con 13,000 %. Para los 14 días la materia orgánica arroja el menor resultado en C con 11,454 %, seguido de B con 11,932 % y por último A con 14,358 %. Finalmente, la materia orgánica a los 21 días muestra los siguientes resultados C con 11,412 %, seguido de B con 11,938 %, y A con 15,104 %.

Figura 3

Variación de materia orgánica con los tratamientos



Nota. La figura 3 muestra la variación de la materia orgánica para los 7, 14 y 21 días en los tres tratamientos descritos, teniendo una variación.

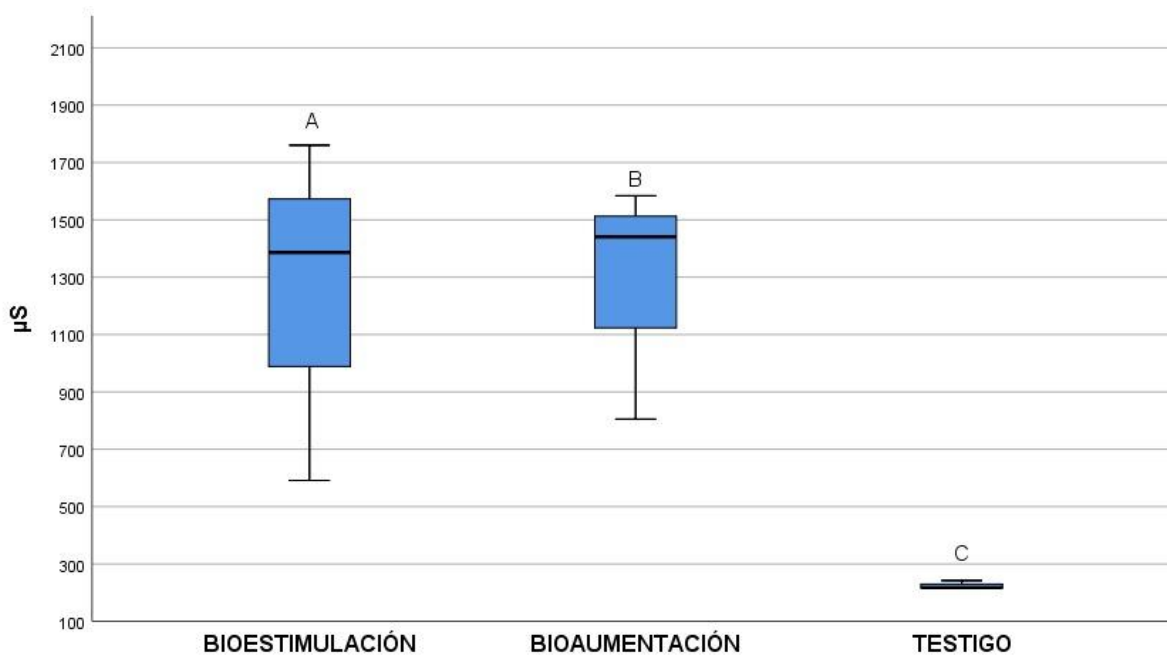
Según la investigación de Galantini, et al. (2008), menciona que “la materia orgánica está asociada con los NPK del suelo estos son directamente relacionados con la disponibilidad de nutrientes a mayor porcentaje mayor remediación.”

De acuerdo con los resultados obtenidos en A se añadieron bacterias que remediaron significativamente el suelo contaminado con hidrocarburos con un resultado de 13 a 15.10% de remoción, los demás tratamientos no obtuvieron una remediación en materia orgánica.

Tabla 6*Resultados de Nitrógeno Kjeldahl total*

Tiempo	Bioestimulación	Bioaumentación	Testigo
7 días	0,04	0,07	0,06
14 días	0,08	0,10	0,07
21 días	0,08	0,10	0,06

En la tabla 6 muestra los resultados de nitrógeno Kjeldahl total a los 7, 14 y 21 días de los tratamientos A, B y C. El menor resultado de nitrógeno Kjeldahl total a los 7 días es A con 0,04 %, seguido de C con 0,06 % y por último B con 0,07 %. Para los 14 días el nitrógeno Kjeldahl total arroja el menor resultado en C con 0,07 %, seguido de A con 0,08 % y por último B con 0,10 %. Finalmente, el nitrógeno Kjeldahl total a los 21 días muestra los siguientes resultados C con 0,06 %, seguido de A con 0,08 %, y B con 0,10 %.

Figura 4*Variación de nitrógeno Kjeldahl total con los tratamientos*

Nota. La figura 4 representa la variación del nitrógeno Kjeldahl total tomando muestras a los 7, 14 y 21 días para los tratamientos establecidos.

Por lo tanto, el nitrógeno total medido por el método Kjeldahl es un parámetro importante para considerar en la biorremediación de suelos contaminados con petróleo, ya que es un nutriente esencial para el crecimiento de los microorganismos degradadores (Iwona & Grzegorz, 2011).

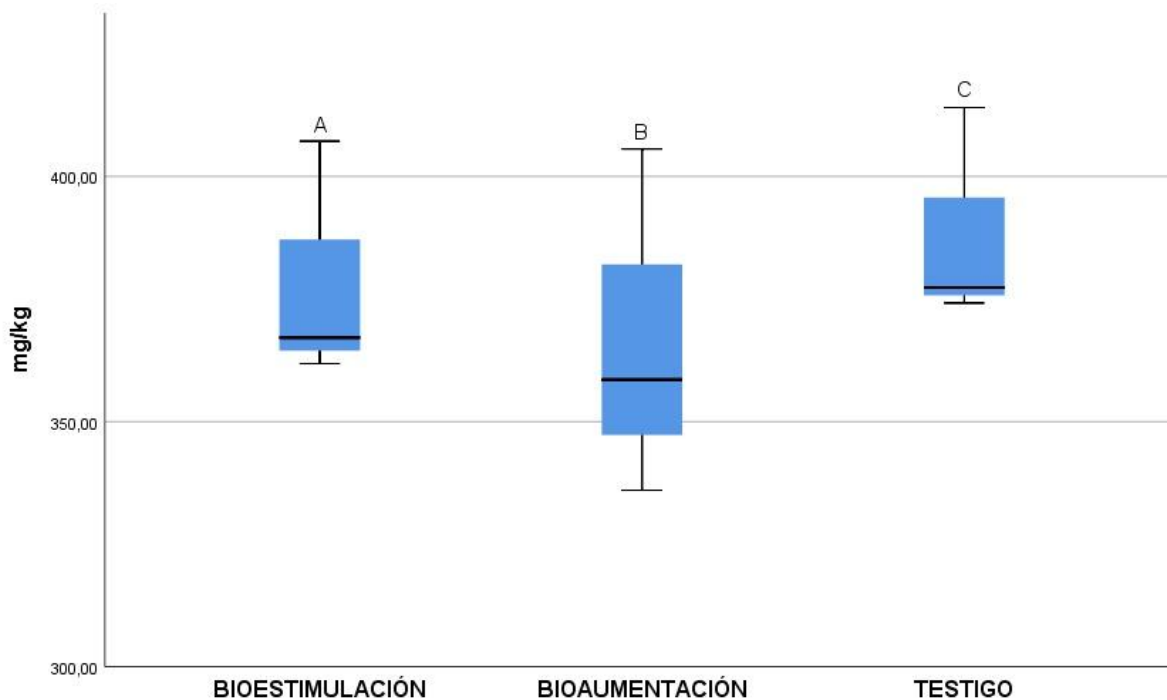
Existe un aumento en los resultados del nitrógeno Kjeldahl total para los dos tratamientos A de 0,04 a 0,08 %, y B de 0,07 a 0,10 % este valor hace referencia al crecimiento de nutrientes del suelo contaminado.

Tabla 7

Resultados de Fósforo

Tiempo	Bioestimulación	Bioaumentación	Testigo
7 días	361,84	336,01	377,34
14 días	407,19	405,58	374,18
21 días	367,11	358,56	414,06

En la tabla 7 muestra los resultados de fósforo a los 7, 14 y 21 días de los tratamientos A, B y C. El menor resultado de fósforo a los 7 días la B con 336,01 mg/kg, seguido de A con 361,84 mg/kg y por último C con 377,34 mg/kg. Para los 14 días el fósforo arroja el menor resultado en C con 374,18 mg/kg, seguido de B con 405.58 mg/kg y por último A con 407,19 mg/kg. Finalmente, el fósforo a los 21 días muestra los siguientes resultados A con 367,11 mg/kg, seguido de B con 358,56 mg/kg, y C con 414,06 mg/kg.

Figura 5*Variación de fósforo con los tratamientos*

Nota. La figura 5 representa la variación de los valores del fósforo en toma de muestras diferentes hasta los 21 días para los tratamientos descritos.

Según el trabajo de investigación realiza por Gibaja & Merino (2008), indica que “el fósforo junto con el nitrógeno está catalogados como nutrientes esenciales para los microorganismos que degradan hidrocarburos”.

Los resultados del fósforo para los tratamientos A y B no existe variación de los 7 a los 21 días con excepción de los 14 días que presenta un aumento, para el tratamiento C se puede notar que hay un aumento en cada una de las muestras para los 7, 14 y 21 días por existe un aumento en los microorganismos de acuerdo a cada tratamiento.

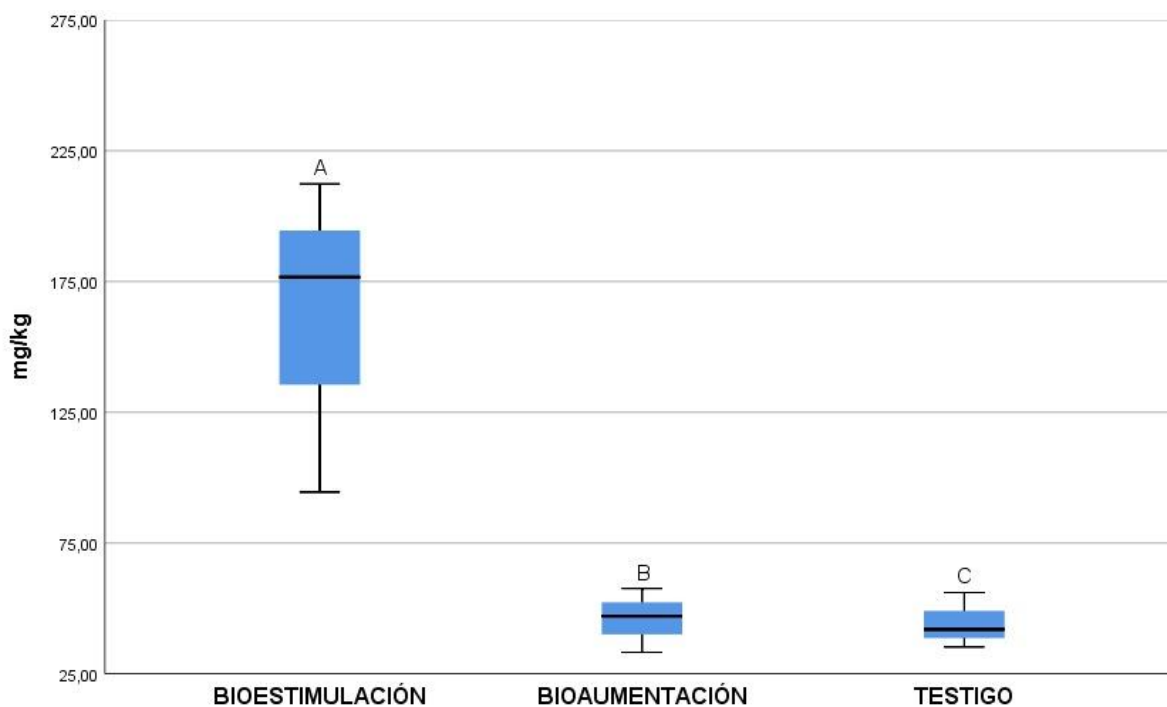
Tabla 8*Resultados de Potasio*

Tiempo	Bioestimulación	Bioaumentación	Testigo
7 días	94,47	47,00	42,00
14 días	176,70	57,63	35,27
21 días	212,30	33,20	56,07

En la tabla 8 muestra los resultados de potasio a los 7, 14 y 21 días de los tratamientos A, B y C. El menor resultado de potasio a los 7 días es C con 42,00 mg/kg, seguido de B con 47,00 mg/kg y por último A con 94,47 mg/kg. Para los 14 días el potasio arroja el menor resultado en C con 35,27 mg/kg, seguido de B con 57,63 mg/kg y por último A con 176,70 mg/kg. Finalmente, el potasio a los 21 días muestra los siguientes resultados B con 33,20 mg/kg, seguido C con 56,07 mg/kg, y A con 212,30 mg/kg.

Figura 6

Variación de potasio con los tratamientos



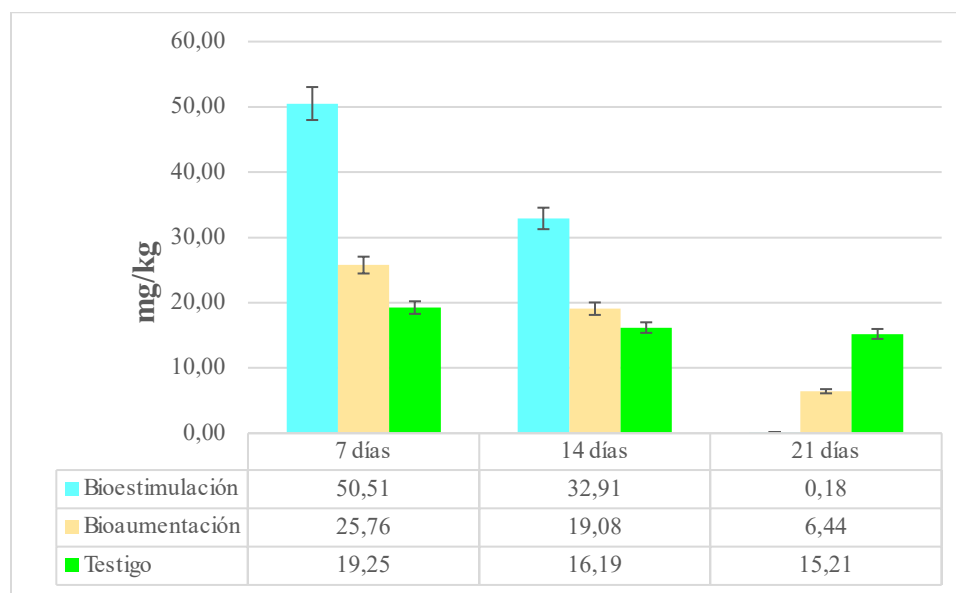
Nota. En la figura 6 según la investigación realizada por Infante & Pérez (2010), que el potasio es un macroelemento que puede tener un efecto positivo sobre la tasa de biodegradación de contaminantes del petróleo. Si el criterio de la biorremediación del suelo fuese más estricto habría que considerar la adición de potasio, el potasio es un acelerador de la biorremediación teniendo como resultado una mejor condición de fertilidad en el suelo.

Para el tratamiento A existe un crecimiento significativo desde los 7 días hasta los 21 días con un valor de 212,30 mg/kg, para B el potasio se reduce de los 7 a los 21 días con un valor de 33,20 mg/kg, para C existe un ligero aumento del potasio de los 7 a los 21 días con un valor de 56,07 mg/kg, es decir que el tratamiento A y el tratamiento C hay un aumento de microorganismos que ayudan a biorremediar el suelo contaminado.

Tabla 9*Resultados de TPH*

Tiempo	Bioestimulación	Bioaumentación	Testigo
7 días	50,51	25,76	19,25
14 días	32,91	19,08	16,19
21 días	0,18	6,44	15,21

En la tabla 9 muestra los resultados de TPH a los 7, 14 y 21 días de los tratamientos bioestimulación, bioaumentación y testigo. El menor resultado de TPH a los 7 días es el testigo 19,251 mg/kg, seguido de la bioaumentación 25,763 mg/kg y por último la bioestimulación 50,511 mg/kg. Para los 14 días los TPH arroja el menor resultado en el testigo 16,186 mg/kg, seguido de la bioaumentación 19,082 mg/kg y por último la bioestimulación 32,909 mg/kg. Finalmente, los TPH a los 21 días muestra los siguientes resultados bioestimulación 0,178 mg/kg, seguido de la bioaumentación 6,435 mg/kg, y el testigo 15,214 mg/kg.

Figura 7*Variación de TPH con los tratamientos*

Nota. En la figura 7 se evidencia una variación considerable de 7 a 21 días para los tratamientos bioestimulación, bioaumentación por último el tratamiento testigo tiene una variación de TPH desde los 7 a 21 días.

Según la investigación de Ojeda, et.al, (2023), muestra que los resultados obtenidos con biorremediación con el tratamiento vermicomposta orgánica se tuvo una mayor remoción de TPH

del 86 % luego de 60 días de incubación, este tratamiento vermicomposta es adecuado para suelos arcillosos ya que la tasa de degradación es mayor y por ende reduce los TPH.

Según las investigaciones de Donoso & Valladolid (2023), menciona en su investigación que la biorremediación por bacterias es eficiente y tiene la capacidad de degradar los hidrocarburos totales del petróleo (TPH) en suelos contaminados con un porcentaje cercano al 86% en un lapso de 28 días.

De acuerdo a la normativa (MAE, 2015) del acuerdo ministerial 097A criterios de remediación para suelos industriales indica que sus valores máximos permisibles de TPH son 620 mg/kg, por lo cual los resultados obtenidos cumplen con la normativa.

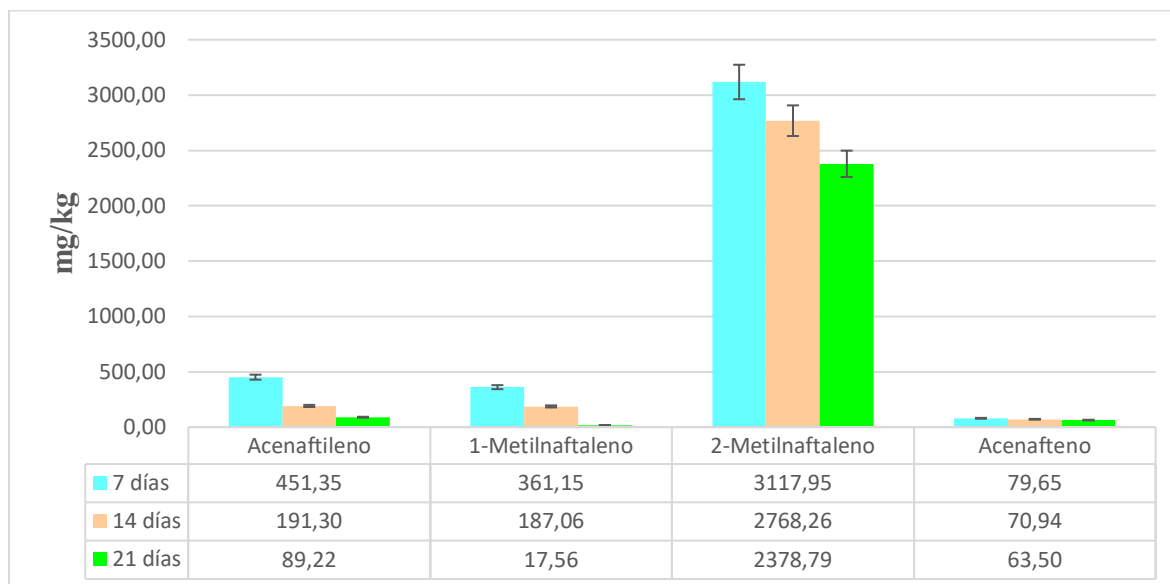
De acuerdo a las investigaciones antes mencionados y a los resultados obtenidos se puede mencionar que debido al tiempo de análisis que son 21 días se tiene una biorremediación en TPH más eficiente en el tratamiento de bioestimulación con 0,178 mg/kg, seguido de la bioaumentación con valores a los 21 días de 6,435 mg/kg, y finalmente el testigo después de los 7 días hasta los 21 días se evidencia biorremediación.

Tabla 10

Resultados de HAP's Bioestimulación

HAP's (Bioestimulación)	Acenaftileno (mg/kg)	1-Metilnaftaleno (mg/kg)	2-Metilnaftaleno (mg/kg)	Acenafteno (mg/kg)
7 días	451,35	361,15	3117,95	79,65
14 días	191,30	187,06	2768,26	70,94
21 días	89,22	17,56	2378,79	63,50

La tabla 10 muestra los HAP's obtenidos a los 21 días del tratamiento bioestimulación dando como resultado mayor reducción en el 1-Metilnaftaleno con un valor de 17,56 mg/kg, seguido del Acenafteno 63,50 mg/kg, después el Acenaftileno con 89,22 mg/kg y finalmente el 2-Metilnaftaleno con 2378,79 mg/kg.

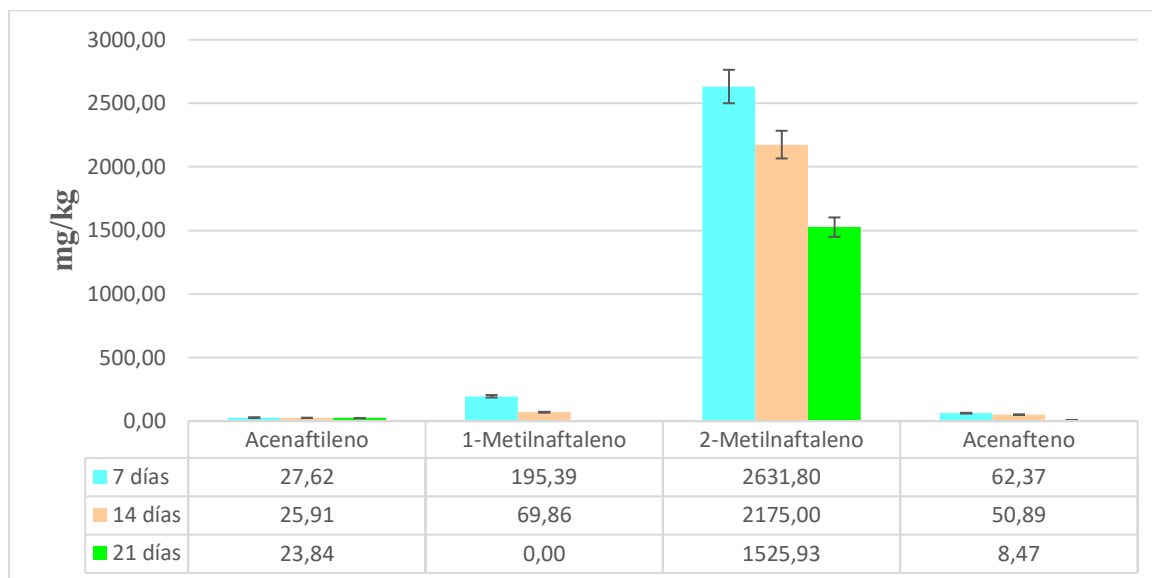
Figura 8*Variación de HAP's con el tratamiento de bioestimulación*

Nota. En la figura 8 muestra que la variación de HAP's con el tratamiento de bioestimulación se tiene que el 2-Metilnaftaleno es difícil de biorremediar a los 21 días.

Tabla 11*Resultados de HAP's Bioaumentación*

HAP's (Bioaumentación)	Acenaftileno (mg/kg)	1-Metilnaftaleno (mg/kg)	2-Metilnaftaleno (mg/kg)	Acenafteno (mg/kg)
7 días	27,62	195,39	2631,80	62,37
14 días	25,91	69,86	2175,00	50,89
21 días	23,84	N/D	1525,93	8,47

La tabla 11 muestra los HAP's obtenidos a los 21 días del tratamiento bioaumentación dando como resultado en el 1-Metilnaftaleno una reducción total, seguido del Acenafteno 8,47 mg/kg, después el Acenaftileno con 23,84 mg/kg y finalmente el 2-Metilnaftaleno con 1525,93 mg/kg.

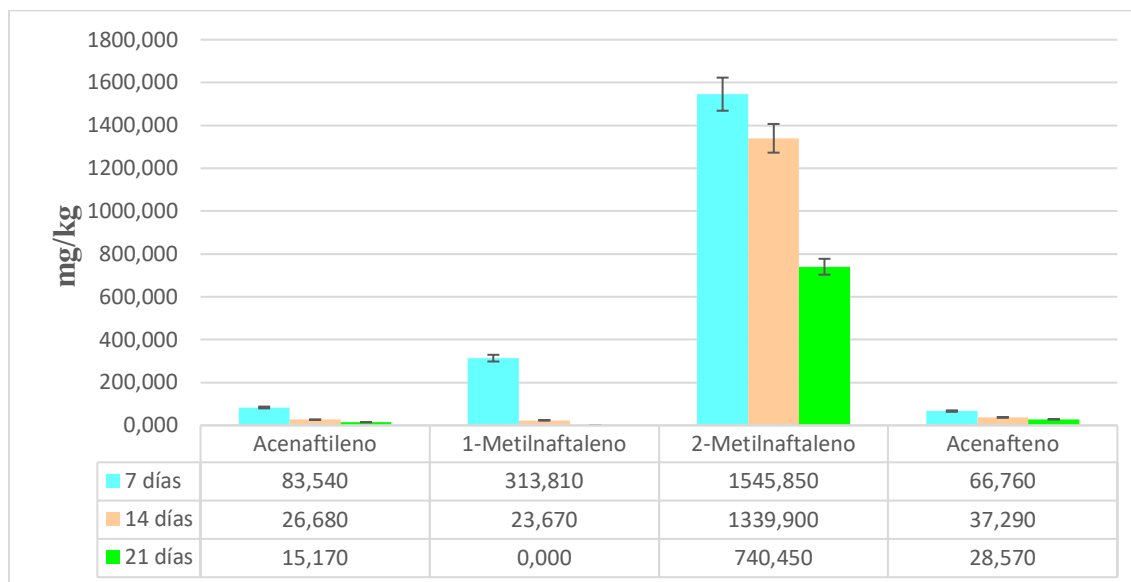
Figura 9*Variación de HAP's con el tratamiento de Bioaumentación*

Nota. En la figura 9 muestra que la variación de HAP's con el tratamiento de bioaumentación se tiene que el 2-Metilnaftaleno es difícil de biorremediar a los 21 días.

Tabla 12*Resultados de HAP's Testigo*

HAP's (Testigo)	Acenaftileno (mg/kg)	1-Metilnaftaleno (mg/kg)	2-Metilnaftaleno (mg/kg)	Acenafteno (mg/kg)
7 días	83,540	313,810	1545,850	66,760
14 días	26,680	23,670	1339,900	37,290
21 días	15,170	N/D	740,450	28,570

La tabla 12 muestra los HAP's obtenidos a los 21 días del tratamiento testigo dando como resultado en el 1-Metilnaftaleno una reducción total, seguido del Acenaftileno 15,17 mg/kg, después el Acenafteno con 28,57 mg/kg y finalmente el 2-Metilnaftaleno con 740,45 mg/kg.

Figura 10*Variación de HAP's con los tratamientos testigo*

Nota. En la figura 10 muestra que la variación de HAP's con el tratamiento testigo se tiene que el 2-Metilnaftaleno es difícil de biorremediar a los 21 días.

5.3. Análisis estadístico de TPH

De a los tres métodos de biorremediación: bioestimulación, bioaumentación y testigo se realizó el siguiente análisis estadístico para verificar la reducción de TPH.

Tabla 13*Resultado de TPH*

Tiempo	Bioestimulación (mg/kg)	Bioaumentación (mg/kg)	Testigo (mg/kg)
7 días	50,51	25,76	19,25
14 días	32,91	19,08	16,19
21 días	0,18	6,44	15,21

La tabla 13 muestra los resultados de TPH para el tratamiento bioestimulación que tiene a los 7 días un valor de 50,51 mg/kg, y a los 21 días existe una reducción de 0,18 mg/kg, para la bioaumentación se tiene a los 7 días un valor de 25,76 mg/kg, y a los 21 días se tiene una disminución de 6,44 mg/kg, finalmente el testigo a los 7 días tiene valores de 19,25 mg/kg, y para los 21 días una reducción de 15, 21 mg/kg.

En la tabla 2 caracterización fisicoquímica del suelo muestra los valores iniciales para TPH de 73,45 mg/kg, el mejor tratamiento a los 7 días siendo el testigo con un valor de 19,25 mg/kg y a los 14 días con valores de 16,19 mg/kg, la bioaumentación a los 14 días tiene una reducción de 19,08 mg/kg, y a los 21 días la bioestimulación con un resultado de 0,18 mg/kg.

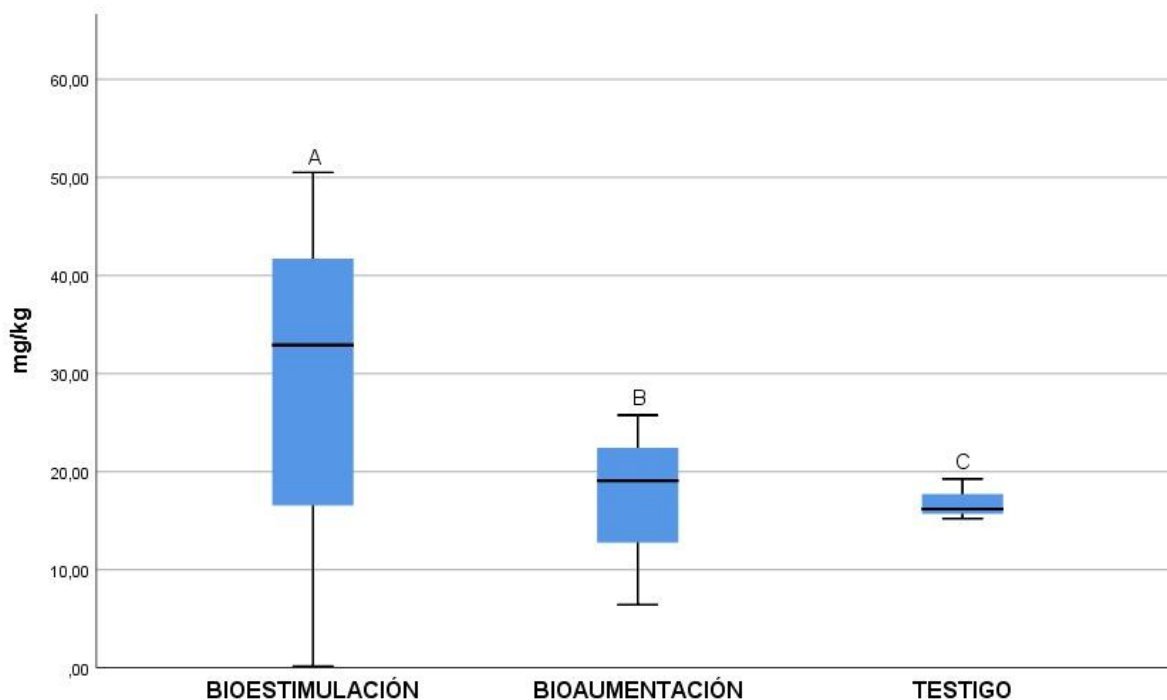
Tabla 14

Análisis estadístico de TPH para los tratamientos a los 7, 14 y 21 días.

		Valor de Bioestimulación	Valor de Bioaumentación	Valor de Testigo
N	Válido	3	3	3
	Perdidos	0	0	0
Media		27,86	17,09	16,88
Mediana		32,90	19,08	16,19
Moda		,18	6,44	15,21
Desv. Desviación		25,54	9,82	2,11
Varianza		652,43	96,36	4,44
Rango		50,33	19,33	4,04
Mínimo		,18	6,44	15,21
Máximo		50,51	25,76	19,25

De acuerdo con el análisis de los resultados de TPH para los tres tratamientos, se tiene que la desviación para la bioestimulación esta cercana a la media por tal razón son datos dispersos, la bioaumentación y el testigo se tiene una desviación más baja que la media por tal razón son datos homogéneos.

Según el promedio el mejor tratamiento para biorremediación del suelo es el testigo con 16,88 mg/kg, seguido del tratamiento bioaumentación que tiene un promedio de 17,09 mg/kg y la bioestimulación con un promedio de 27,86 mg/kg.

Figura 11*Análisis estadístico boxplot TPH*

Nota. En la figura 11 nos muestra que para el tratamiento A los datos se encuentran dispersos en el bigote, para el tratamiento B y C se tiene que no son datos atípicos y no tienen datos dispersos.

Tabla 15*Análisis estadístico ANOVA con el 5%*

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	236,70	2	118,35	,471	,65
Dentro de grupos	1506,45	6	251,07		
Total	1743,15	8			

Se tuvo como resultado del sig 0,65 donde es mayor a 0,05 que indica que se acepta la hipótesis alternativa donde menciona que si se reducen los TPH y se rechaza la hipótesis nula que menciona que no se reducen los TPH. Es decir que si se reduce las concentraciones de los TPH de acuerdo con la biorremediación del suelo.

Para la bioestimulación existe una biorremediación a los 21 días con un valor de 0,18 mg/kg. Para la bioaumentación se tiene una biorremediación del suelo a los 21 días de 6,44 mg/kg, es decir que estos tratamientos si reducen los TPH. Para el tratamiento de testigo a los 21 días se tiene 15,21 mg/kg, como resultado se tiene la presencia de TPH en mayor grado de concentración.

Tabla 16

Prueba de TUKEY 5%

Subconjunto para alfa = 0.05		
Grupo	N	1
Testigo	3	16,88
Bioaumentación	3	17,09
Bioestimulación	3	27,86
Sig.		,68

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

De acuerdo con el análisis de Tukey se tiene que los tres tratamientos si proporcionan biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos de acuerdo con el valor inicial 73,45 mg/kg y las medias establecidas; testigo 16,88 mg/kg, bioaumentación 17,09 y bioestimulación con 27,86 mg/kg.

5.4. Análisis estadístico de HAP's

De a los tres métodos de biorremediación: bioestimulación, bioaumentación y testigo se realizó el siguiente análisis estadístico para verificar la reducción de HAP's.

Tabla 17

Resultado de HAP's

Tiempo	Bioestimulación (mg/kg)	Bioaumentación (mg/kg)	Testigo (mg/kg)
7 días	4010,10	2917,18	2009,96
14 días	3217,56	2321,66	1427,54
21 días	2549,07	1558,24	784,19

La tabla 17 muestra los resultados de HAP's para el tratamiento bioestimulación que tiene a los 7 días un valor de 4010,10 mg/kg, y a los 21 días existe una reducción de 2549,07 mg/kg, para la bioaumentación se tiene a los 7 días un valor de 2917,18 mg/kg, y a los 21 días se tiene una disminución de 1558,24 mg/kg, finalmente el testigo a los 7 días tiene valores de 2009,96 mg/kg, y para los 21 días una reducción de 784,19 mg/kg.

En la tabla 2 muestra los valores iniciales para HAP's de 4521,10 mg/kg, el mejor tratamiento a los 7 días siendo el testigo con un valor de 2009,96 mg/kg y a los 14 días con valores de 1427,54 mg/kg, y finalmente a los 21 días reduce un valor de 784,19 mg/kg.

Tabla 18

Análisis estadístico de HAP's para los tratamientos a los 7, 14 y 21 días.

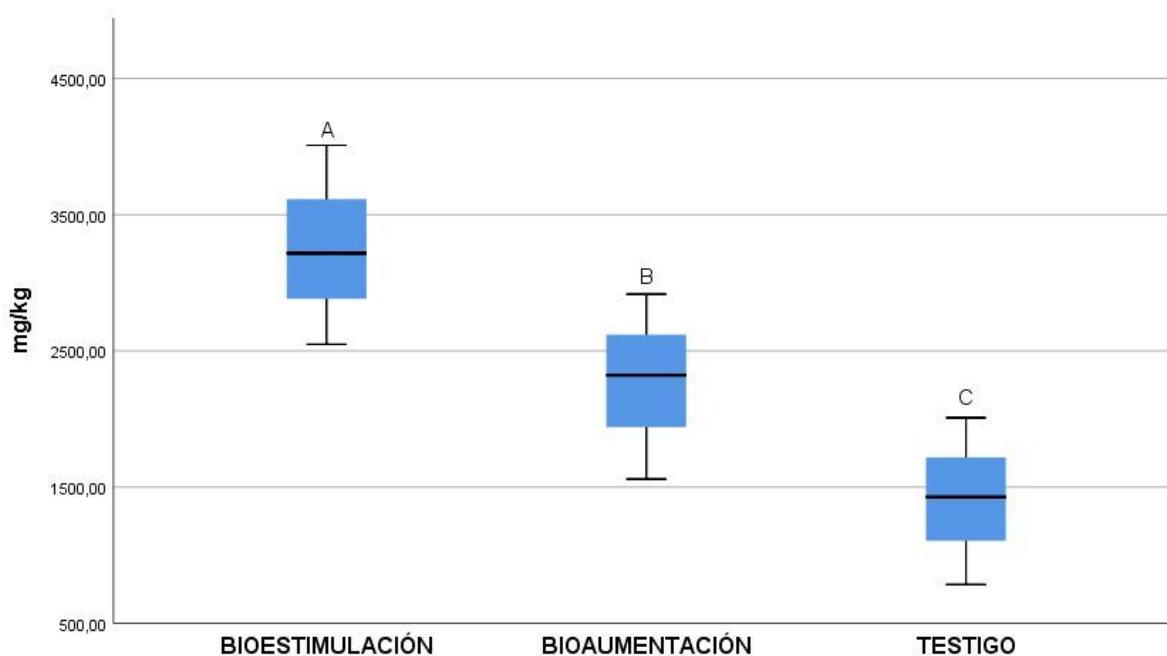
		Valor de la Bioestimulación	Valor de la Bioaumentación	Valor del Testigo
N	Válido	3	3	3
	Perdidos	0	0	0
Media		3258,91	2265,69	1407,23
Mediana		3217,56	2321,66	1427,54
Moda		2549,07	1558,24	784,19
Desv. Desviación		731,39	681,19	613,13
Varianza		534934,53	464028,68	375937,39
Asimetría		,25	-,36	-,14
Error estándar de asimetría		1,22	1,22	1,22
Rango		1461,03	1358,94	1225,77
Mínimo		2549,07	1558,24	784,19
Máximo		4010,10	2917,18	2009,96

De acuerdo con el análisis de los resultados de HAP's para los tres tratamientos, se tiene que la desviación es menor a la media por tal razón son datos homogéneos, la bioaumentación y el testigo tienen un promedio bajo con relación a la bioestimulación.

Según el promedio el mejor tratamiento para biorremediación del suelo es el testigo con 1407,23 mg/kg, seguido del tratamiento bioaumentación que tiene un promedio de 2265,69 mg/kg y la bioestimulación con un promedio de 3258,91 mg/kg.

Figura 12

Análisis estadístico boxplot HAP's



Nota. En la figura 12 nos muestra que para los tratamientos A, B y C, no tienen datos atípicos, es decir que no hay datos alejados de la media.

Tabla 19

Análisis estadístico ANOVA con el 5%

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5152157,46	2	2576078,73	5,62	,042
Dentro de grupos	2749801,21	6	458300,20		
Total	7901958,68	8			

Se tuvo como resultado del sig 0,042 donde es menor a 0,05 que indica que se acepta la hipótesis nula donde menciona que no reducen los HAP's y se rechaza la hipótesis alternativa que menciona que se reducen los HAP's. Es decir que no se reducen las concentraciones de los HAP's de acuerdo con la biorremediación del suelo.

Para el testigo existe una biorremediación a los 21 días con un valor de 784,19mg/kg. Para la bioaumentación se tiene una biorremediación del suelo a los 21 días de 1558,24 mg/kg, es decir que estos tratamientos si reducen los HAP's a proporciones muy variadas. Para el tratamiento de bioestimulación a los 21 días se tiene 2549,07 mg/kg, como resultado se tiene la presencia de HAP's en alto grado de concentración.

Tabla 20

Prueba de TUKEY 5%

Subconjunto para alfa =			
0.05			
Grupo	N	1	2
Testigo	3	1407,23	
Bioaumentación	3	2265,69	
Bioestimulación	3		3258,91
Sig.		,33	,24

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

De acuerdo con el análisis de Tukey se tiene mejor resultado de biorremediación del suelo para los dos tratamientos (testigo y bioaumentación) desde los 7 días a los 21 días, sin embargo, se tuvo que el tratamiento bioestimulación no difieren en el resultado de los 7 a los 21 días.

5.5. Discusión

Analizando los resultados de la tabla 2 caracterización fisicoquímica del suelo, se puede evidenciar que TPH presenta un valor inicial de 73,45 mg/kg, aplicando los tres tratamientos (bioestimulación, bioaumentación y testigo se obtienen los siguientes resultados:

En los 7 primeros días se logra una biorremediación del suelo más eficiente con el tratamiento testigo con un valor de 19,25 mg/kg para los 14 días el mejor tratamiento sigue siendo el testigo

con 16,19 mg/kg de TPH, seguido del tratamiento bioaumentación con 19,08 mg/kg. Finalmente, para los 21 días el tratamiento más eficiente es la bioestimulación con un valor de 0,18 mg/kg de TPH.

Con esto se puede decir que el testigo es eficiente a los primeros 14 días de biorremediación ya que las bacterias limpian los hidrocarburos totales del petróleo del suelo, pero para cubrir una biorremediación total se requiere del tratamiento bioestimulación ya que las bacterias se adaptan al suelo y después limpian los hidrocarburos casi en su totalidad.

Según el acuerdo ministerial 097A (MAE, 2015) criterios de remediación para suelos industriales indica que sus valores máximos permisibles de TPH son 620 mg/kg, por lo cual los resultados obtenidos cumplen con la normativa.

Analizando las tablas 10, 11, 12 se tiene que para los tratamientos de bioestimulación, bioaumentación y testigo el HAP's con más concentración es el 2-Metilnaftaleno siendo este difícil de biorremediar ya que se encuentra en una concentración muy alta.

Los HAP's cuentan con valores iniciales de 4521,10 mg/kg, aplicando tres tratamientos (bioestimulación, bioaumentación y testigo) se tiene los siguientes resultados:

Analizando la tabla 17 donde muestra los tratamientos para los 7 primeros días se tiene una biorremediación del suelo más eficiente con el testigo con un valor de 2009,96 mg/kg, para los 14 días se tiene que el mejor tratamiento sigue siendo el testigo con 1427,54 mg/kg de HAP's, finalmente para los 21 días el testigo cuenta con un valor de 784,19 mg/kg.

Para continuar con la biorremediación de suelos en HAP's se debería continuar con un estudio que tenga mayor duración que se enfoque en la biorremediar el 2-Metilnaftaleno.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- El suelo contaminando de la base Triboilgas es de tipo franco arcillo arenoso, este cumple con la normativa establecida en el acuerdo ministerial 097A, referente a criterios de remediación, en los parámetros de pH (6,24), conductividad eléctrica (171,00 $\mu\text{S}/\text{cm}$) y TPH (73,45 mg/kg).
- Los tratamientos aplicados (bioestimulación, bioaumentación y testigo) muestra que el pH obtiene valores de 6,2 a 7,4; esto indica que la muestra es neutra y se encuentra dentro de los parámetros normales establecidos dentro del acuerdo ministerial 097A. Los valores de la conductividad eléctrica muestran un valor de 1760 $\mu\text{S}/\text{cm}$ bioestimulación, 1584 $\mu\text{S}/\text{cm}$ bioaumentación y 216 $\mu\text{S}/\text{cm}$ testigo respectivamente los dos primeros valores no entran en los parámetros de la norma establecida y el testigo si entra en la normativa establecida en el acuerdo ministerial 097A.
- La biorremediación de los TPH en el suelo contaminado, inició en 73,45 mg/kg con una reducción en el tratamiento de bioestimulación del 99,75% a los 21 días de incubación siendo el mejor tratamiento con un valor de 0,178 mg/kg, seguido de bioaumentación con el 91,24% equivalente a 6,44 mg/kg, finalmente el testigo con una reducción de 79,28% equivalente a 15,21 mg/kg. En la investigación se tiene una reducción positiva en TPH, en los tratamientos para (7, 14 y 21 días), es decir que si existe una biorremediación del suelo y estos se encuentran dentro de los parámetros de la normativa del acuerdo ministerial 097A criterios de remediación para suelos industriales.
- La Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos muestran un valor inicial de 4521,10 mg/kg, aplicando los tratamientos para la biorremediación del suelo para los 21 días se obtiene los siguientes resultados; en la bioestimulación se reducen un 43,62% con un valor final de 2549,07 mg/kg, la bioaumentación con el 61,46% teniendo un valor de 1558,24 mg/kg y finalmente el testigo con el 82,65% siendo el mejor tratamiento para la biorremediación del suelo con un valor final de 784,19 mg/kg. Se puede mencionar que los tratamientos uno y dos reducen los HAP's en bajas proporciones, debido a la complejidad del 2-Metilnaftaleno requiere un proceso de mayor tiempo o con bacterias que sean

especializadas para este tipo de aromáticos, que posiblemente no se encontraban en los tratamientos anteriormente mencionados.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar ensayos con diferentes concentraciones y bajo el tratamiento de bioestimulación para verificar la reducción de TPH en los suelos contaminados con hidrocarburos.
- Se recomienda realizar un análisis más específico de biorremediación para la reducción del 2-Metilnaftaleno ya que es un HAP's muy difícil de reducir con los tratamientos aplicados en un periodo establecido de 21 días
- Se recomienda a la empresa Triboilgas hacer la aplicación de los métodos de biorremediación y capacitación al personal en los procesos para reducir HAP's y TPH presentes en los suelos contaminados generados debido a la actividad petrolera.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-Awadhi, H. (2002). Impact of oil spills on soil and groundwater in the greater Burgan oil field, Kuwait. *Environmental Geology*, 42(3), 282. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17879161/>
- Andrades, M., Moliner, A., & Masaguer, A. (2015). Prácticas de Edafología Métodos didácticos para análisis de suelos. *Universidad de la Rioja*. <http://publicaciones.unirioja.eswww.unirioja.es>
- ATSDR. (2016). Resumen de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HPAs). Atlanta. https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.html#
- Avila, T., Bersano, J., & Fillmann, G. (2010). Lethal and Sub-Lethal Effects of the Water-Soluble Fraction of a Light Crude Oil on the Planktonic Copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology*, 20-21. <https://periodicos.univali.br/index.php/eec/article/view/3038/1939>
- Benavides, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S., & Miranda, J. (2006). Benavides, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S., Miranda J. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. 4, 82. <https://www.redalyc.org/pdf/411/41140509.pdf>
- Castillo, R., More, F., & Cornejo, M. (2020). Aislamiento de bacterias con potencial biorremediador y análisis de comunidades bacterianas de zona impactada por derrame de petróleo en Condorcanqui. *Scielo*, 22(3). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2313-29572020000300215
- Castro, G. (2007). *INFORME FINAL DISEÑO MONITOREO FRENTE DERRAMES DE HIDROCARBUROS*. Chile. https://www.sag.cl/sites/default/files/INFORME_FINAL_ASESORIA_SAG_HCS2.pdf
- Cevallos, T., & García, J. (2018). "EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS UTILIZANDO *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa*". <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15681>
- Cevallos, T., & García, J. (2018). *EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS UTILIZANDO *Aspergillus niger*, *Pleurotus**

- ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis posgrado, Quito.
<http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15681>
- Chamorro, A., Monard, N., Páez, F., & León, C. (2013). *EL Petróleo en el Ecuador la nueva era petrolera*. EP PETROECCUADOR. Quito: Manthra Comunicación integral y Producción editorial. <https://www.eppetroecuador.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/03/El-Petr%C3%B3leo-en-el-Ecuador-La-Nueva-Era.pdf>
- Donoso, D., & Valladolid, J. (2023). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a través de microorganismos nativos a nivel de laboratorio*. Tesis posgrado, Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga.
<https://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/11391/1/PC-003068.pdf>
- Fernández, J., Bohórquez, W., & Rodríguez, A. (2016). Dinámica nutricional bajo diferentes tratamientos de fertilización con N, P y K en suelos. *Revista Colombia de ciencias hortícolas*, 10(2).
- Galantini, J., Landriscini, M., & Hevia, C. (2008). Contenido y calidad de la materia orgánica particulada del suelo. *Aapresid*. https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/25723/CONICET_Digital_Nro%2024532%20A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Garzón, J., Rodríguez, J., & Hernández, C. (2017). Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible. *Revisión*, 314.
<https://revistas.udenar.edu.co/index.php/usalud/article/view/3120/pdf>
- Gavilanez, T. (2013). *Determinación de la biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos*. Ambato. <http://eprints.uanl.mx/23814/1/1080328506.pdf>
- Gibaja, E., & Merino, F. (2008). *Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo*. Perú. https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/245/Samanez_ge.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=La%20bioestimulaci%C3%B3n%20de%20microorganismos%20hidrocarbono%20l%C3%A1sticos,contaminados%20con%20crudo%20de%20petr%C3%B3leo
- Godleads, A., Prekeyi, F., Samson, O., & Igelenyah, E. (2015). Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3(1), 28-39. https://www.researchgate.net/publication/277216237_Bioremediation_Biostimulation_and_Bioaugmentation_A_Review

- Gómez , W., Gaviria , J., & Cardona , S. (2009). EVALUACIÓN DE LA BIOESTIMULACIÓN FRENTE A LA ATENUACIÓN NATURAL Y LA BIOAUMENTACIÓN EN UN SUELO CONTAMINADO CON UNA MEZCLA DE GASOLINA - DIESEL. *SCIELO*, 76(160). http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0012-73532009000400008&script=sci_arttext
- Guevara , M. (2016). *Reseña: Hidrocarburos Totales del Petróleo (TPHs)*. Atlánta. <https://repositorio.uea.edu.ec/bitstream/123456789/117/1/T.AMB.B.UEA.%203033>
- Infante, C. (2021). CRITERIOS Y TECNOLOGÍAS DE REMEDIACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS. *Academia de ciencias físicas matemáticas y naturales*, 81(1). <https://acfiman.org/wpcontent/uploads/2022/07/LXXXI.N1.P29-34.2021.pdf>
- Infante, C., & Pérez, R. (2010). Efecto del potasio en la biorremediación de un suelo contaminado con un crudo liviano. *Scielo*, 22(2). https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1316-33612010000200007&script=sci_arttext
- Iturbe, R., Flores, C., Chávez, C., & Roldán, A. (2001). Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas. *Ingeniería Investigación y Tecnología*. <http://dx.doi.org/10.22201/fi.25940732e.2002.03n1.004>
- Iwona, Z., & Grzegorz, M. (2011). Effects of Bioaugmentation and Biostimulation on Enhancing Biodegradation of Oil Hydrocarbons Contaminated Soils. *ResearchGate*. <https://www.researchgate.net/publication/226732829>
- Izquierdo, J., & Arévalo , J. (10 de Agosto de 2021). Determinación de la materia orgánica del suelo (MOS) por el método químico y por calcinación. *Revista Ingeniería y Región*, 26.
- Jiménez, J., & Getsemani, L. (2021). *La biorremediación como una alternativa de limpieza ambiental*. México . <https://contexto.udlap.mx/la-biorremediacion-como-una-alternati-va-de-limpieza-ambiental/>
- Lara, P. (2022). *Evaluación de Pleurotus ostreatus en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. Tesis posgrado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Ibarra, Ibarra.
- Lasso , A. (2007). FOSFORO SOLUBLE EN AGUA POR EL METODO DEL ÁCIDO ASCORBICO. 3.

- Licta, E. (2020). *BIOAUMENTACIÓN MEDIANTE EL USO DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS PARA EL TRATAMIENTO DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO*. Tesis posgrado, Riobamba. <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/14264>
- López , J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S., & Miranda, J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo . *NOVA*, 4(5), 82.
- Lujan, D. (2019). Uso de de Pseudomonas en biorremediación. Programa de posgrado en infectología . *Universidad Federal de Minas Gerais. Biotecnología* , 23(1). https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/105612/De%20la%20Cruz_QMM-Requejo_MEJ-SD.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- MAE. (2015). Registro Oficial Edición Especial 387. Ministerio del Ambiente: <https://www.gob.ec/regulaciones/acuerdo-ministerial-097-anexos-normativa-reforma-libro-vi-texto-unificado-legislacion-secundaria-ministerio-ambiente>
- Martínez, C., Morales, C., & Alor, M. (2016). EXTRACCIÓN DE HIDROCARBURO PESADO EN SUELO ARENOSO. *EXECUTIVE Business School*, 8(1). <https://www.redalyc.org/journal/3236/323650376002/html/>
- Martínez, V., & López, F. (2001). Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra Latinoamericana*, 19(1), 14.
- Muñoz, J., & Pacheco, M. (2017). *Colonias bacterianas presentes en suelos contaminados por petróleo*. Universidad Nortbert Wiener, Lima. <https://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/564>
- Ojeda, M., Morales, C., & López, J. (2023). Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos empleando sustancias húmicas de vermicomposta. *SCIELO*, 41(1). https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-57792023000100123&script=sci_arttext
- Ortiz , R., Cram, S., & Sommer, I. (2011). Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en suelos de la llanura aluvial baja del estado de Tabasco. *Scielo*, 131-132. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-2979201200020003

- Peña, A., & Castillo, A. (2015). Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM). *TIP Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 18(1). http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2015000100003
- Pérez, E., & Esquivel, R. (Junio de 2018). Adecuación de metodologías para análisis de sodio y potasio por espectroscopía de absorción atómica, en sales de rehidratación oral. *Tecnología en Marcha*, 31(2). <https://www.scielo.sa.cr/pdf/tem/v31n2/0379-3982-tem-31-02-40.pdf>
- Petro, P., & Mercado, G. (2014). BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR DERRAMES DE HIDROCARBUROS DERIVADOS DEL PETRÓLEO EN COLOMBIA. https://d1wqtxtslxzle7.cloudfront.net/38373951/Biorremediacion_de_suelos_contaminados_por_derrames_Piedad_Petro_Cardona_USBCTG_2014-libre.pdf?1438655546=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3
- Pila, M., Ruíz, D., Colasurdo, D., & Allegretti, P. (2022). Hidrocarburos aromáticos polinucleares. *SEDICI*. Obtenido de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/141105>
- Rakowska, J. (2020). Remediation of diesel-contaminated soil enhanced with firefighting foam application. *Scientific*, 10(8824). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65660-3>
- Ramírez, I., Vargas, A., & Arroyave, A. (30 de 11 de 2020). Relación entre el pH y las mediciones de conductividad eléctrica en un suelo cultivable. *INGENIERÍAS USBMed*, 13(2). <http://portal.amelica.org/ameli/journal/536/5363548006/>
- Reagents, I. (2017). Determinación de Nitrógeno por el Método Kjeldahl. https://www.itwreagents.com/uploads/20180122/A173_ES.pdf
- Riojas, H., Torres, L., Mondaca, I., Balderas, J., & Gortáres, P. (2010). Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Química Viva*, 9(3), 120-145. <https://www.redalyc.org/pdf/863/86315692003.pdf>
- Ruiz, A. (2019). *La Biorremediación Como Técnica Para La Descontaminación De Suelos Contaminados Por Hidrocarburos En Los Municipios Del Bloque Cpo9*. Posgrado, Colombia. <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/27737/asruizo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Siguenza, F. (2007). *El Petroleo en el Ecuador y sus antecedentes locales*. Quito. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15446/1/UPS-QT12601.pdf>

- Suarez, R. (2013). GUÍA DE MÉTODOS DE BIORREMEDIACIÓN PARA LA RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS. <https://hdl.handle.net/10901/10607>
- Trujillo, M., & Ramírez, J. (2012). Biorremediación en suelos contaminados. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 38-39.
- Vallejo, V., Salgado, L., & Roldan, F. (2005). Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Colomb. Biotecnol*, VII(2), 68. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/501/898>
- Vanzetto, G., & Thomé, A. (2022). Toxicity of nZVI in the growth of bacteria present in contaminated soil. *ScienceDirect*, 303(1). <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653522014953?via%3Dihub>
- Velasco, J., & Volke, T. (2003). El composteo: una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. *Gaceta Ecológica*(66), 41. <https://www.redalyc.org/pdf/539/53906604.pdf>

ANEXOS

Anexo 1.

Registro fotográfico



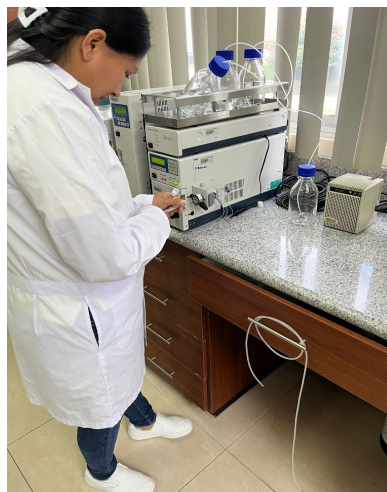
a. Toma de muestra de suelos contaminados con hidrocarburos.



b. Homogenización de muestras y recolección de datos iniciales.



c. Mediciones de Hidrocarburos totales del petróleo.



d. Mediciones de Hidrocarburos totales del petróleo.

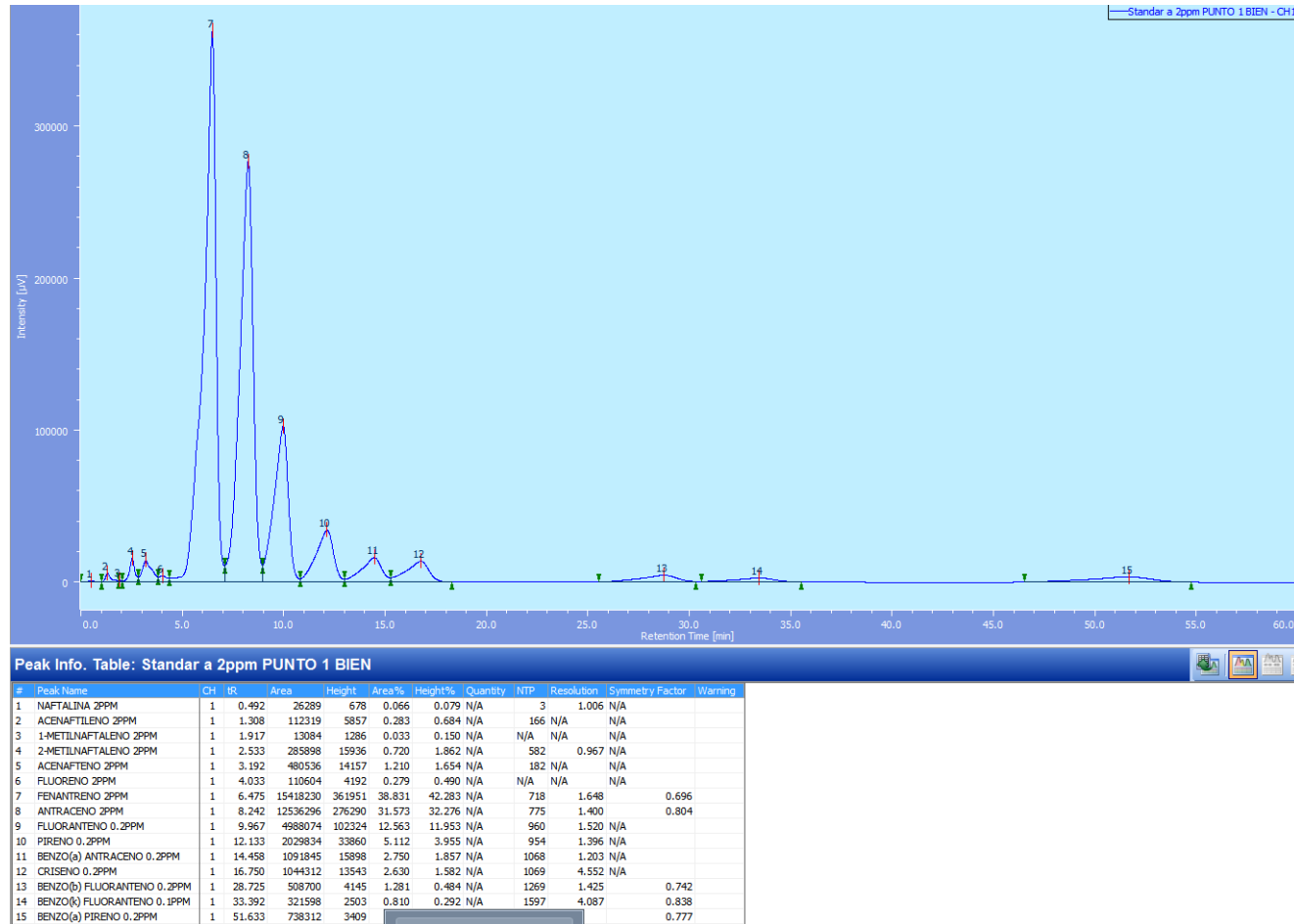
Anexo 2.**Picos estándar HAP's con tiempos de retención para curva de calibración**

N°	Picos	Tiempo de retención	PUNTO 1 (2PPM)		PUNTO 2 (1PPM)		PUNTO 3 (0,5PPM)		PUNTO 4 (0,25PPM)		PUNTO 5 (0,125PPM)		PUNTO 6 (0,0625PPM)	
			AREA	HEIGHT	AREA	HEIGHT	AREA	HEIGHT	AREA	HEIGHT	AREA	HEIGHT	AREA	HEIGHT
1	NAFTALINA	0,492	26289	678										
2	ACENAFTILENO	1,308	112319	5857	61738	4365	29310	2176	25170	1363	29190	1163	16745	982
3	1-METILNAFTALENO	1,917	13084	1286	6015	605	7378	803	7720	825	6195	668	6835	733
4	2-METILNAFTALENO	2,533	285898	15936	121831	8919	56098	3783	30033	1913	16568	967	5893	404
5	ACENAFTENO	3,192	480536	14157	205668	6333	28665	2894	54207	1779	31482	962	23558	497
6	FLUORENO	4,033	110604	4192	22740	1165	3010	254						
7	FENANTRENO	6,475	15418230	361951	7950779	190627	4028657	97454	2095197	51619	1060084	26494	50277	12962
8	ANTRACENO	8,242	12536296	276290	6807540	154902	3537955	82240	1853410	44246	947606	22930	438045	11214
9	FLUORANTENO	9,967	4988074	102324	2531424	52042	1267924	26258	659410	13961	336187	7201	152532	3477
10	PIRENO	12,133	2029834	33860	962685	16763	470245	8322	247833	4450	123041	2270	51024	1015
11	BENZO (a) ANTRACENO	14,458	1091845	15898	494932	7628	213200	3531	112567	1891	55696	977	14213	361
12	CRISENO	16,750	1044312	13543	513745	6776	214312	3164	113016	1690	54880	862	9454	248
13	FLUORANTENO BENZO (b)	28,725	508700	4145	262301	2108	39589	591	10529	185				
14	FLUORANTENO BENZO (k)	33,392	321598	2503	163664	1256	8620	153						
15	BENZO (a) PIRENO	51,633	738312	3409	304574	1585	23502	233						

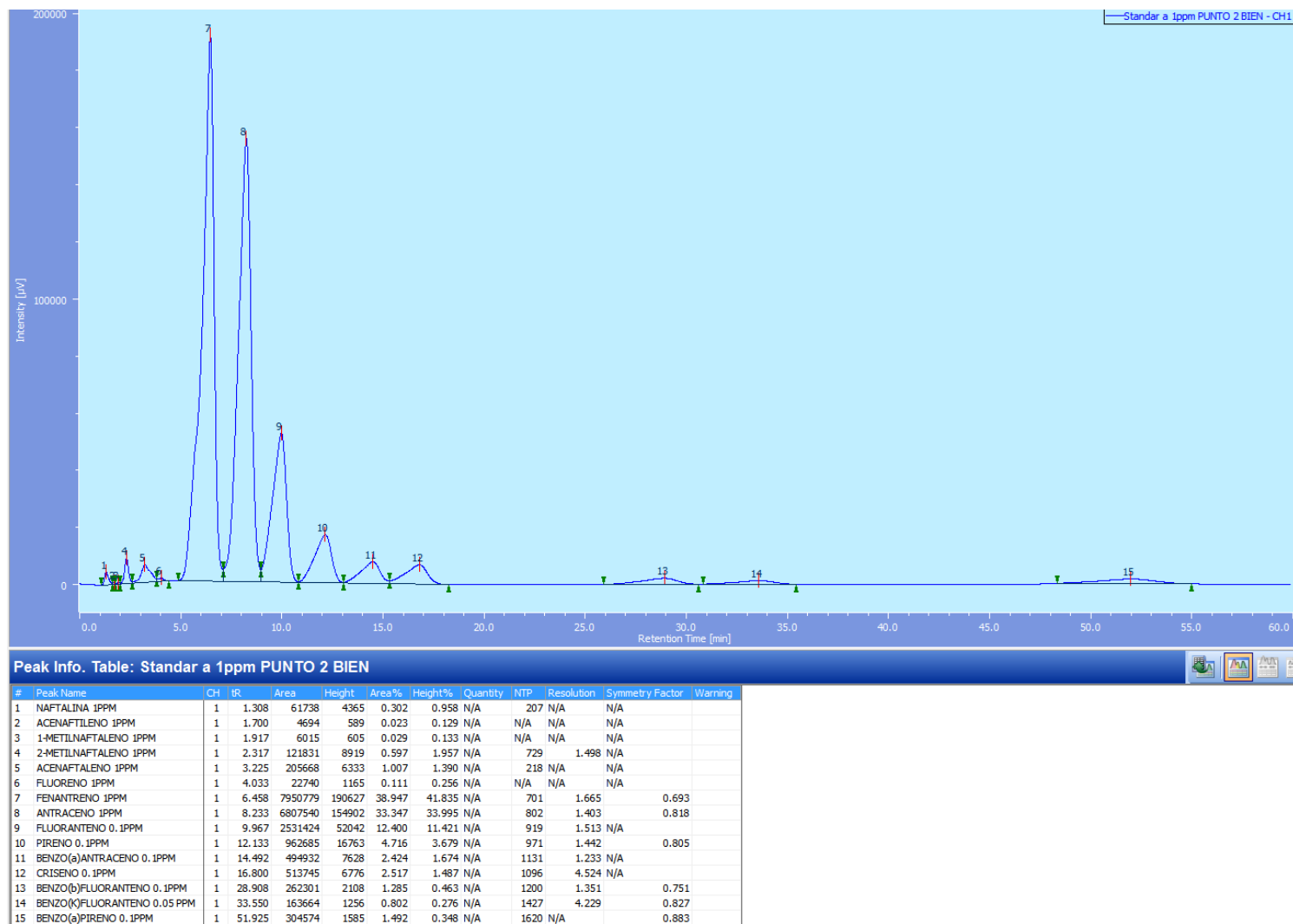
Anexo 3.

Picos de la curva de calibración estándar HAP's

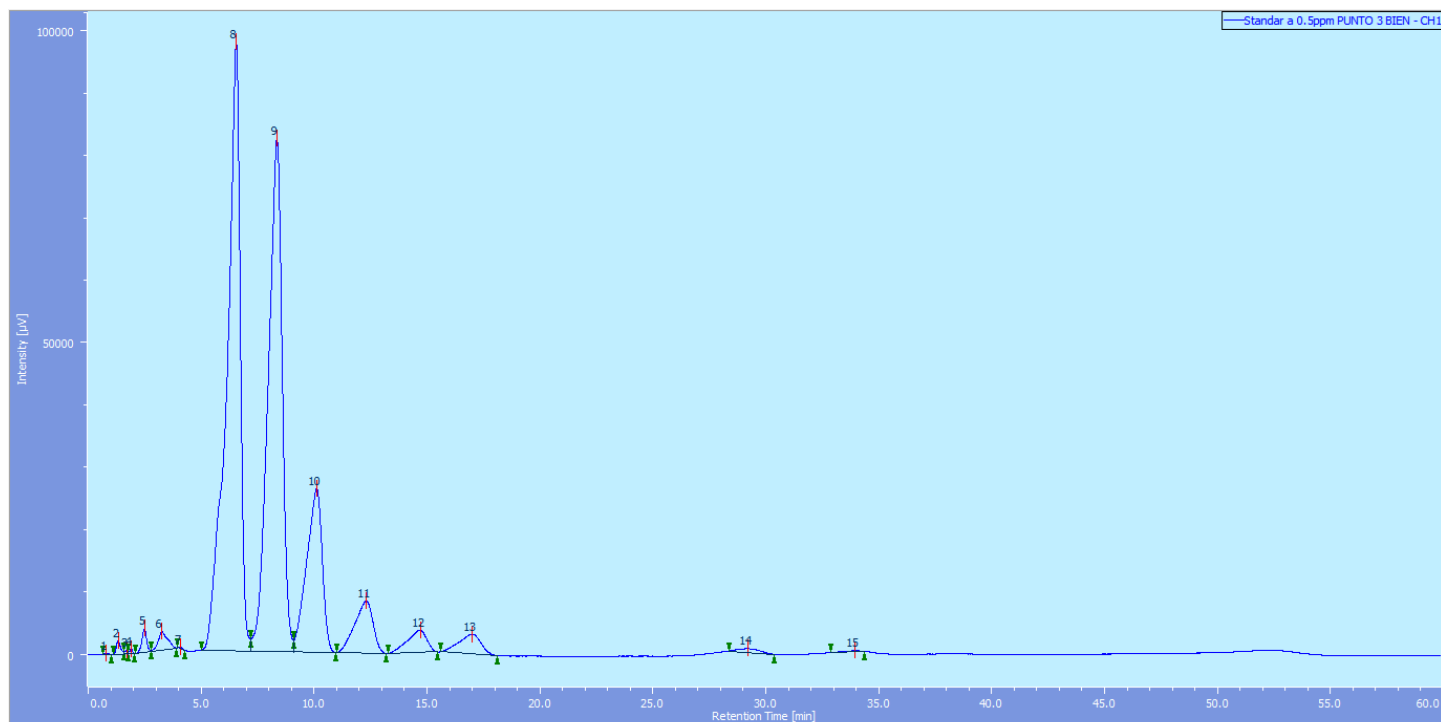
Concentración 2PPM



Concentración 1 PPM



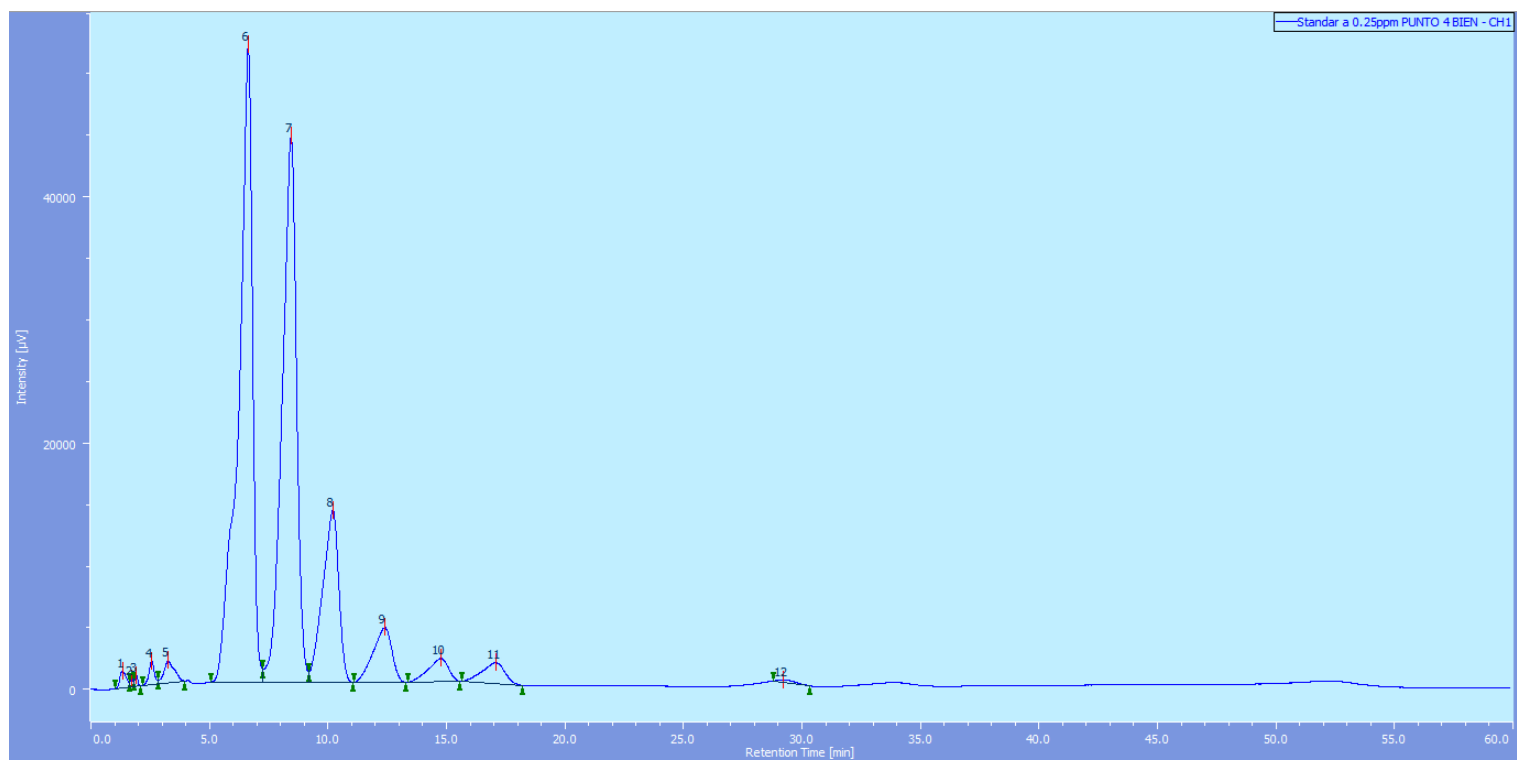
Concentración 0.5 PPM



Peak Info. Table: Standar a 0.5ppm PUNTO 3 BIEN

#	Peak Name	CH	IR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor	Warning
1	ND	1	0.800	2875	245	0.029	0.105	N/A	95	1.562		1.131
2	ACENAFTILENO 0.5PPM	1	1.325	29310	2176	0.294	0.936	N/A	235	N/A	N/A	
3	ND2	1	1.700	5339	601	0.054	0.258	N/A	N/A	N/A	N/A	
4	1-METILNAFTALENO 0.5PPM	1	1.908	7378	803	0.074	0.345	N/A	803	1.789	N/A	
5	2-METILNAFTALENO 0.5PPM	1	2.483	56098	3783	0.563	1.627	N/A	701	1.353		0.971
6	ACENAFTENO 0.5PPM	1	3.267	82665	2894	0.829	1.245	N/A	277	1.438	N/A	
7	FLUORENO 0.5PPM	1	4.067	3010	254	0.030	0.109	N/A	2429	3.893		1.297
8	FENANTRENO 0.5PPM	1	6.550	4028657	97454	40.419	41.921	N/A	762	1.737		0.689
9	ANTRACENO 0.5PPM	1	8.350	3537955	82240	35.496	35.377	N/A	875	1.448		0.817
10	FLUORANTENO 0.05PPM	1	10.108	1267924	26258	12.721	11.295	N/A	959	1.547	N/A	
11	PIRENO 0.05PPM	1	12.300	470245	8322	4.718	3.580	N/A	1026	1.511		0.802
12	BENZO(a) ANTRACENO 0.05PPM	1	14.692	213200	3531	2.139	1.519	N/A	1286	1.330		0.751
13	CRISENO 0.05PPM	1	16.992	214312	3164	2.150	1.361	N/A	1380	6.538		0.836
14	BENZO(b) FLUORANTENO 0.05PPM	1	29.200	39589	591	0.397	0.254	N/A	3720	2.656		1.164
15	BENZO(k) FLUORANTENO 0.025	1	33.942	8620	153	0.086	0.066	N/A	6652	N/A		0.679

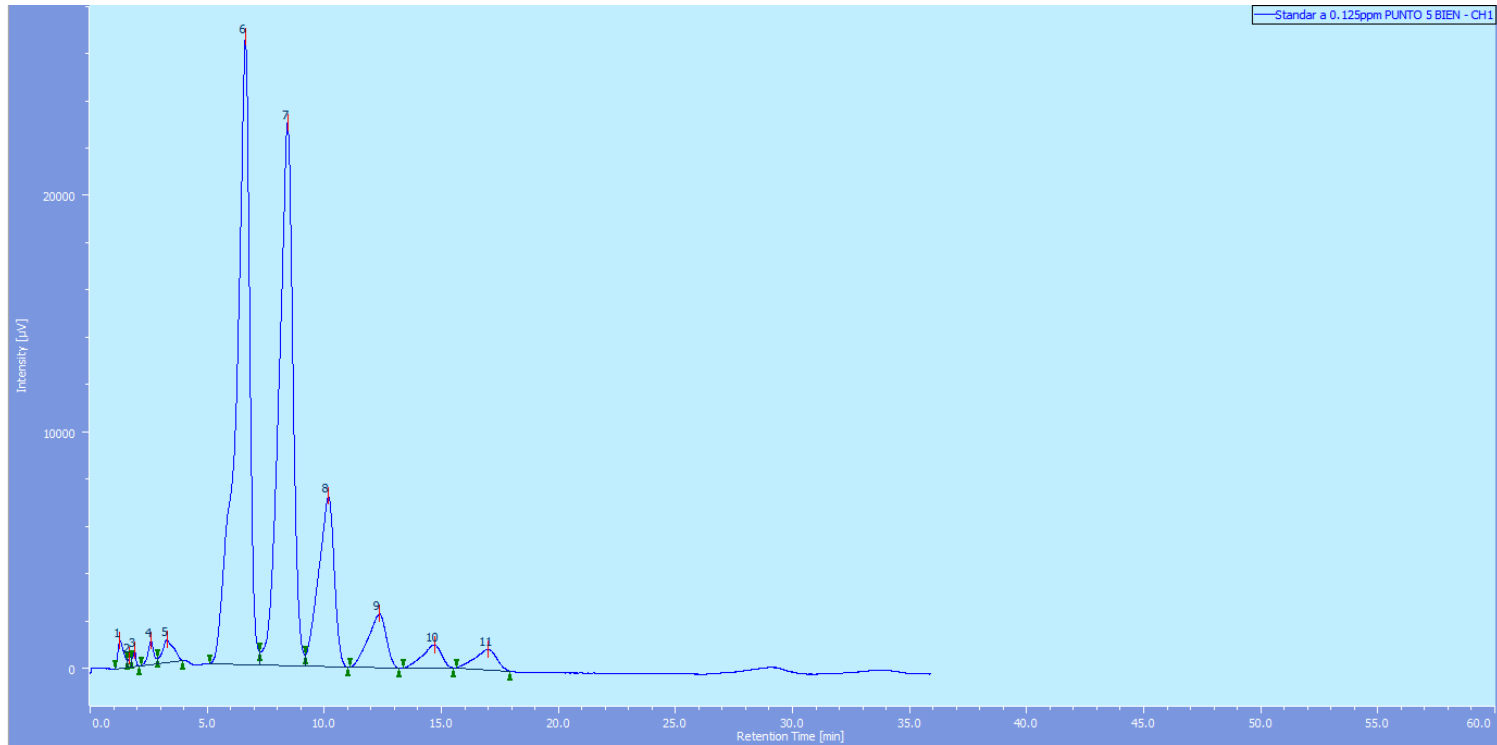
Concentración 0.25 PPM



Peak Info. Table: Standar a 0.25ppm PUNTO 4 BIEN

#	Peak Name	CH	IR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor	Warning
1	ACENAFITILENO 0.25PPM	1	1.325	25170	1363	0.483	1.094	N/A	104	N/A	N/A	
2	Peak-002	1	1.717	5580	636	0.107	0.511	N/A	N/A	N/A	N/A	
3	1-METILNAFTALENO 0.25PPM	1	1.925	7720	825	0.148	0.662	N/A	N/A	N/A	N/A	
4	2-METILNAFTALENO 0.25PPM	1	2.558	30033	1913	0.576	1.536	N/A	684	1.159	N/A	
5	ACENAFITILENO 0.25PPM	1	3.258	54207	1779	1.040	1.428	N/A	252	3.917	N/A	
6	FENANTRENO 0.25PPM	1	6.633	2095197	51619	40.179	41.442	N/A	854	1.817	0.690	
7	ANTRACENO 0.25PPM	1	8.442	1853410	44246	35.542	35.522	N/A	963	1.495	0.819	
8	FLUORANTENO 0.025PPM	1	10.200	659410	13961	12.645	11.209	N/A	1031	1.590	N/A	
9	PIRENO 0.025PPM	1	12.400	247833	4450	4.753	3.573	N/A	1088	1.519	0.800	
10	BENZO(a) ANTRACENO 0.025PPM	1	14.750	112567	1891	2.159	1.518	N/A	1361	1.370	0.780	
11	CRISENO 0.025PPM	1	17.067	113016	1690	2.167	1.357	N/A	1451	7.240	0.841	
12	BENZO(b) FLUORANTENO 0.025PPM	1	29.175	10529	185	0.202	0.149	N/A	5583	N/A	1.921	

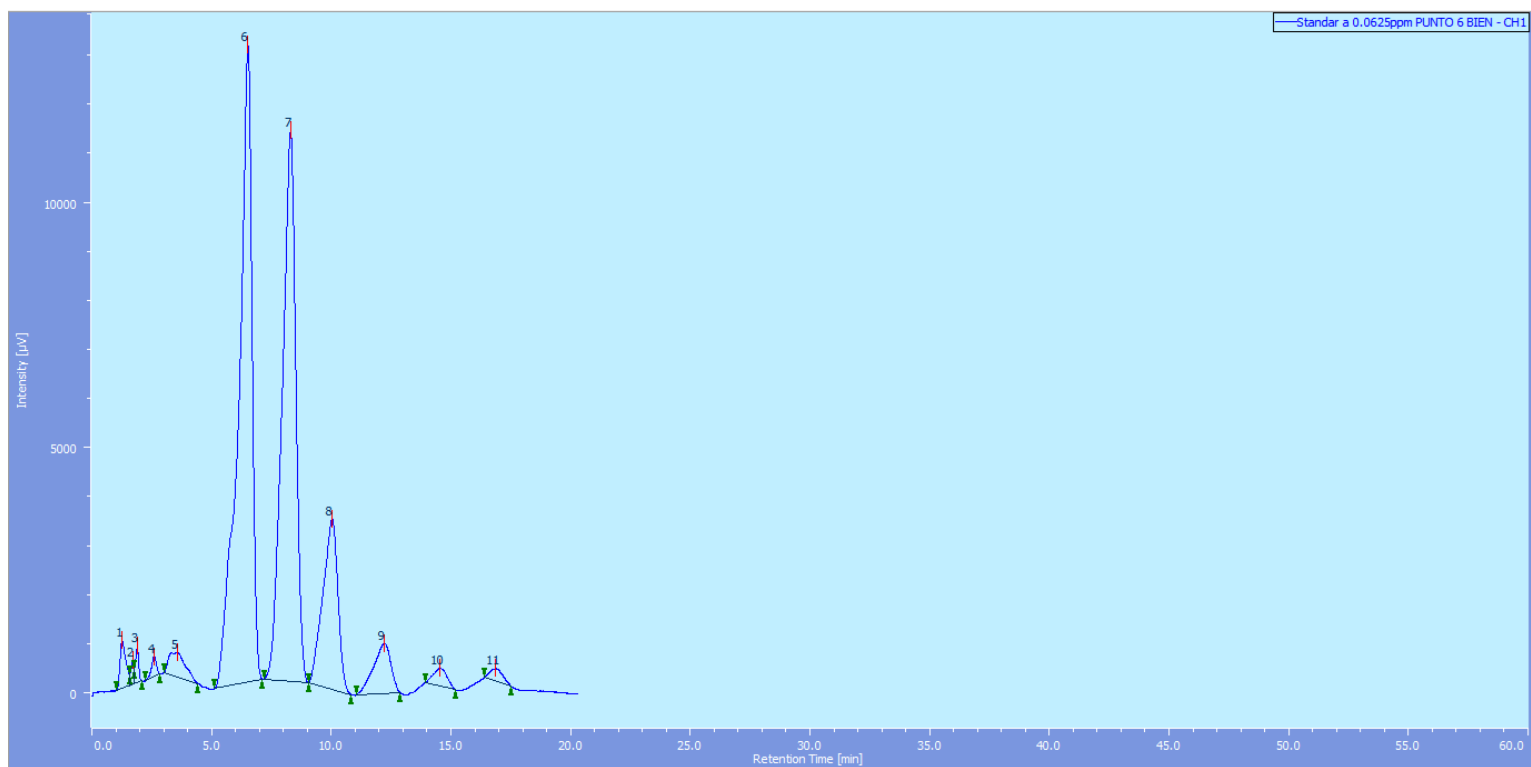
Concentración 0.125 PPM



Peak Info. Table: Standar a 0.125ppm PUNTO 5 BIEN

#	Peak Name	CH	IR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor	Warning
1	ACENAFTILENO 0.125PPM	1	1.267	20190	1163	0.760	1.790	N/A	113	N/A	N/A	
2	Peak-002	1	1.692	3820	459	0.144	0.706	N/A	N/A	N/A	N/A	
3	1-METILNAFTALENO 0.125PPM	1	1.908	6195	668	0.233	1.028	N/A	690	1.936	N/A	
4	2-METILNAFTALENO 0.125PPM	1	2.592	16568	967	0.624	1.489	N/A	618	1.020	N/A	
5	ACENAFTENO 0.125PPM	1	3.275	31482	962	1.185	1.481	N/A	200	3.716	N/A	
6	FENANTRENO 0.125PPM	1	6.633	1060084	26494	39.917	40.790	N/A	897	1.849	0.689	
7	ANTRACENO 0.125PPM	1	8.433	947606	22930	35.681	35.303	N/A	1000	1.513	0.819	
8	FLUORANTENO 0.0125PPM	1	10.183	336187	7201	12.659	11.086	N/A	1058	1.604	N/A	
9	PIRENO 0.0125PPM	1	12.350	123041	2270	4.633	3.495	N/A	1150	1.573	0.802	
10	BENZO(a) ANTRACENO 0.0125	1	14.692	55696	977	2.097	1.504	N/A	1479	1.428	0.776	
11	CRISENO 0.0125 PPM	1	16.992	54880	862	2.066	1.327	N/A	1595	N/A	0.819	

Concentración 0.0625 PPM



Peak Info. Table: Standar a 0.0625ppm PUNTO 6 BIEN

#	Peak Name	CH	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor	Warning
1	ACENAFTILENO 0.0625PPM	1	1.258	16745	982	1.369	3.031	N/A	117	N/A	N/A	
2	Peak-002	1	1.700	3968	490	0.324	1.512	N/A	N/A	N/A	N/A	
3	1-METILNAFTALENO 0.0625PPM	1	1.900	6835	733	0.559	2.264	N/A	756	2.142	N/A	
4	2-METILNAFTALENO 0.0625PPM	1	2.600	5893	404	0.482	1.248	N/A	754	1.137	0.824	
5	ACENAFTENO 0.0625PPM	1	3.558	23558	497	1.925	1.536	N/A	118	2.711	1.256	
6	FENANTRENO 0.0625PPM	1	6.517	501237	12962	40.967	40.028	N/A	884	1.876	0.681	
7	ANTRACENO 0.0625PPM	1	8.300	438045	11214	35.803	34.630	N/A	1040	1.570	0.826	
8	FLUORANTENO 0.03125PPM	1	10.033	152532	9477	12.467	10.737	N/A	1149	1.729	0.829	
9	PIRENO 0.03125PPM	1	12.208	51024	1015	4.170	3.134	N/A	1331	1.904	0.778	
10	BENZO(a) ANTRACENO 0.03125PPM	1	14.525	14213	361	1.162	1.113	N/A	2781	2.109	1.046	
11	CRISENO 0.03125PPM	1	16.833	9454	248	0.773	0.767	N/A	3795	N/A	1.253	

Anexo 4.

Análisis de los tratamientos

BIOESTIMULACIÓN 7 DÍAS							
	Height						Concentración mg/kg
ACENAFTILENO	3693,4	547,94	3882	0,903	50	45,135	451,350
1-METILNAFTALENO	327,43	632,5	869	0,722	50	36,115	361,150
2-METILNAFTALENO	7936,4	10,973	49502	6,236	50	311,798	3117,950
ACENAFTENO	7057,5	249,31	875	0,159	50	7,965	79,650

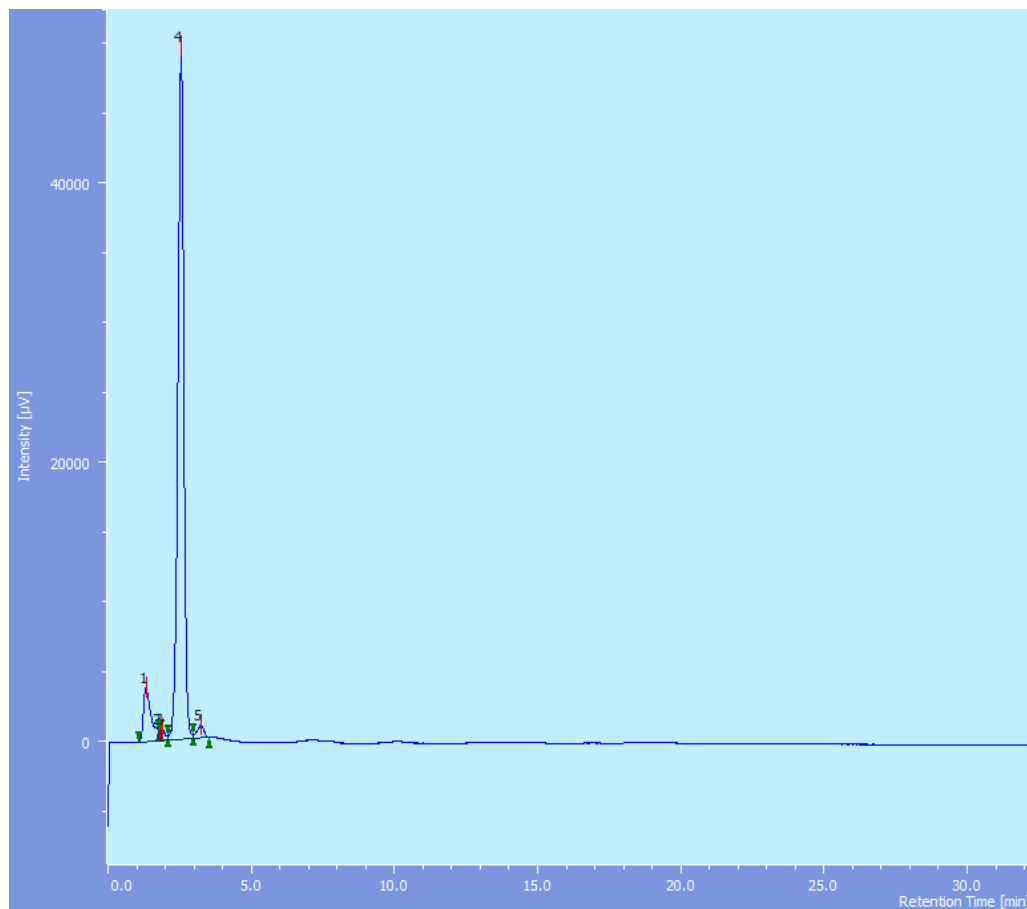
BIOAUMENTACIÓN 7 DÍAS							
	Height						Concentración mg/kg
ACENAFTILENO	3693,4	547,94	1228	0,184	15	2,762	27,620
1-METILNAFTALENO	327,43	632,5	1059	1,303	15	19,539	195,390
2-METILNAFTALENO	7936,4	10,973	139258	17,545	15	263,180	2631,800
ACENAFTENO	7057,5	249,31	2685	0,416	15	6,237	62,370

TESTIGO 7 DÍAS							
	Height						Concentración mg/kg
ACENAFTILENO	3693,4	547,94	1165	0,167	50	8,354	83,540
1-METILNAFTALENO	327,43	632,5	838	0,628	50	31,381	313,810
2-METILNAFTALENO	7936,4	10,973	24548	3,092	50	154,585	1545,850
ACENAFTENO	7057,5	249,31	693	0,134	50	6,676	66,760

Anexo 5.

Resultado de HAP's

Pico tratamiento Bioestimulación (melaza) 7 días



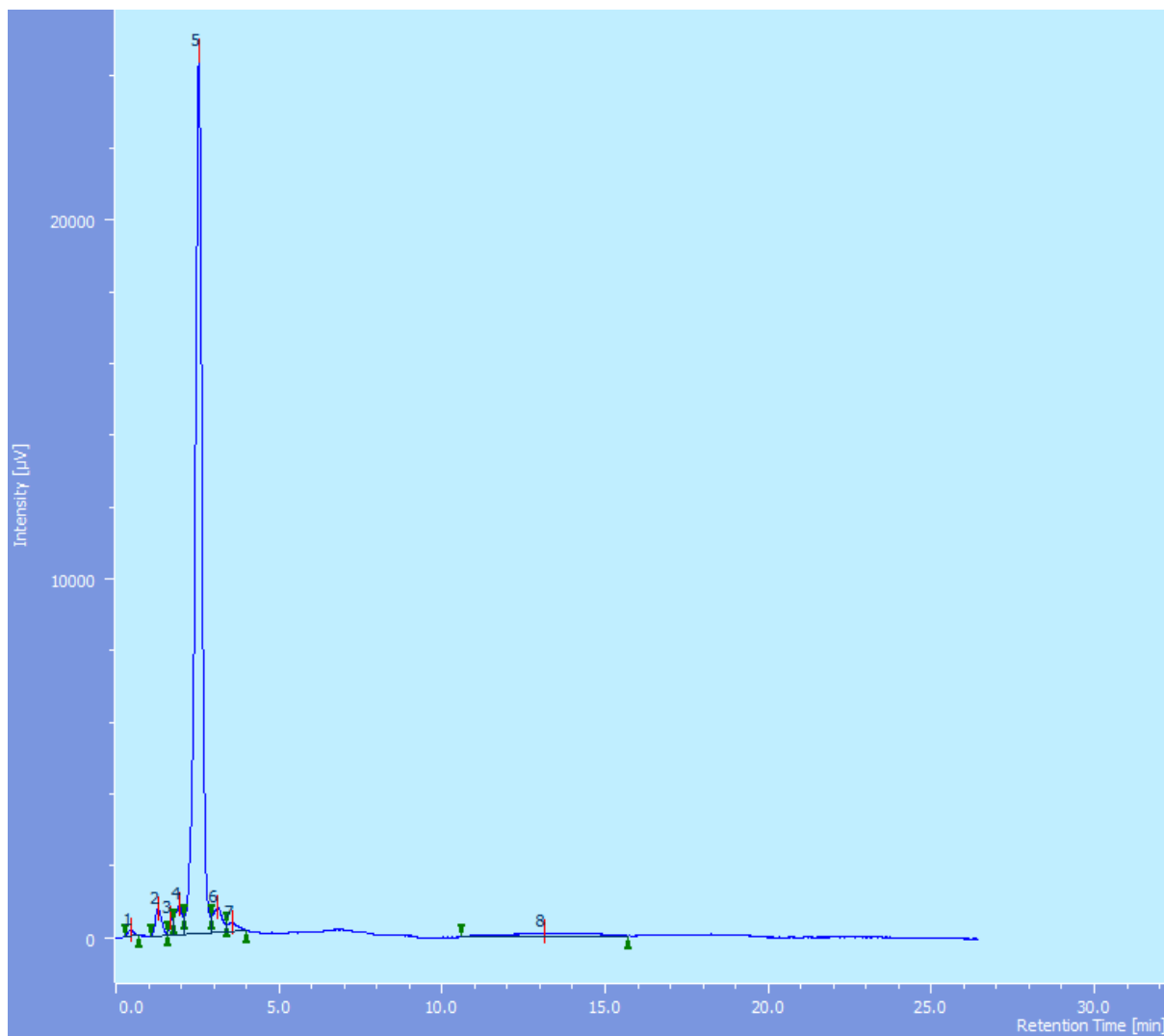
#	Peak Name	CH	tR	Área	Height
1	ACENAFTILENO 451.350 PPM	1	1.325	73235	3882
2	1-METILNAFTALENO 361.150 PPM	1	1.900	7857	869
3	2-METILNAFTALENO 3117.950 PPM	1	2.550	704897	49502
4	ACENAFTENO 79.650 PPM	1	3.242	15092	875

Pico tratamiento Bioaugmentación (suelo nativo de Mojanda) 7 días



#	Peak Name	CH	tR	Área	Height
1	ACENAFTILENO 451.350 PPM	1	1.275	21387	1228
2	1-METILNAFTALENO 361.150 PPM	1	1.908	12451	1059
3	2-METILNAFTALENO 3117.950 PPM	1	2.550	2068535	139258
4	ACENAFTENO 79.650 PPM	1	3.233	50166	2685

Pico tratamiento testigo (agua) 7 días



#	Peak Name	CH	tR	Área	Height
1	ACENAFTILENO 451.350 PPM	1	1.283	10400	1165
2	1-METILNAFTALENO 361.150 PPM	1	1.942	12516	838
3	2-METILNAFTALENO 3117.950 PPM	1	2.542	365314	24548
4	ACENAFTENO 79.650 PPM	1	3.125	13770	693