

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**CARRERA DE MICROBIOLOGÍA**

**Bioestimulación como estrategia de modificación de la estructura de  
suelos arcillosos contaminados con hidrocarburos**

**Disertación previa a la obtención del título de Microbióloga**

**FRANCISCA DOMINIQUE CAÑADAS GARCÉS**

**Quito, 2023**



Certifico que la Disertación en Microbiología de la Srta. Francisca Dominique Cañadas Garcés ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

*Diana Astorga G.*

**PhD. Diana Astorga García**

Directora de la Disertación

## **DEDICATORIA**

A mi abuelito, que desde el cielo me guía, por darme la oportunidad para salir adelante.

A mi familia, por acompañarme y apoyarme en cada paso para ser mejor persona y profesional.

A mí.  
Por creer en mí, confiar en el proceso y nunca desistir.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi mamá y a mi papá por el cariño y apoyo incondicional, por estar siempre presentes y alentarme a cumplir todos mis objetivos. A mi hermana, por ser motivo e impulso para progresar y ser mejor cada día. Gracias a ustedes por el soporte económico y emocional que necesité para culminar esta etapa.

Le agradezco profundamente a mi tutora, Diana Astorga, por haberse convertido en mi guía personal y profesional desde que comencé la carrera. Por su tiempo, dedicación, consejos y paciencia. Por enseñarme a ser mi mejor versión y tenerme siempre en cuenta para sus proyectos o eventos. Gracias infinitas por nunca dejar de confiar en mí y en mi potencial.

Doy las gracias a la PUCE, a los docentes de la carrera de Microbiología, a Bolívar Salas y la directora del proyecto, por el soporte constante para terminar mi proyecto.

A Verónica Luna, por brindarme su apoyo siempre que necesité, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo y darme la confianza para llevar a cabo esta investigación. Agradezco el financiamiento y los recursos otorgados para concretar la fase de terrarios de esta experimentación en su laboratorio de Microbiología Agrícola del Campus PUCE Nayón.

Por último, doy gracias al Proyecto “Amazonía Viva” de EP PETROECUADOR por abrirme las puertas del Complejo Industrial del Campo Sacha - Bloque 60, para poder llevar a cabo la fase de campo de mi proyecto, el financiamiento y los recursos proporcionados para la disertación. Gracias a los miembros del CITGAV por haberme otorgado la grata experiencia de compartir con ellos y servir de apoyo en los proyectos e iniciativas del laboratorio de microbiología.

Esta disertación se inscribe dentro del Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos MAAE-DBI-CM-2019-0125-A del programa de investigación “Diversidad microbiana en diferentes ecosistemas acuáticos y terrestres del territorio ecuatoriano”.

**TABLA DE CONTENIDOS**

1	RESUMEN.....	1
2	ABSTRACT.....	2
3	INTRODUCCIÓN .....	3
3.1.	OBJETIVOS.....	6
3.1.1.	OBJETIVO GENERAL .....	6
3.1.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
3.2.	HIPÓTESIS .....	6
4	MATERIALES Y MÉTODOS .....	7
4.1	Área de estudio .....	7
4.2	Toma de muestras .....	7
4.3	Análisis fisicoquímicos del suelo contaminado.....	9
4.4	Recuento de bacterias y hongos.....	10
4.5	Respiración de suelo .....	11
4.6	Montaje del ensayo .....	11
4.7	Análisis estadísticos.....	13
5	RESULTADOS.....	14
6	DISCUSIÓN.....	20
6.1	Granulometría y textura de suelo.....	21
6.2	Hidrocarburos totales de petróleo (TPH).....	22
6.3	Análisis fisicoquímicos.....	24
6.4	Respiración de suelo y recuentos microbianos .....	29
7	CONCLUSIONES .....	32
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
9	ANEXOS.....	44

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Diseño experimental con la distribución y composición de los tratamientos en fase de terrarios. Tiempo de duración, frecuencia de aplicación de tratamientos y riego.

**Figura 2.** Diseño experimental con la distribución y composición de los tratamientos en fase de biopilas. Tiempo de duración, frecuencia de aplicación de tratamientos y riego.

**Figura 3.** Distribución aleatoria de las biopilas con cada tratamiento de bioestimulación por triplicado en la plataforma de escalamiento del campo Sacha, Bloque 60 de EP PETROECUADOR.

**Figura 4.** Sistema de aireación por tuberías de Policloruro de Vinilo (PVC) para ensayos estáticos en campo.

**Figura 5.** Niveles de TPH de la muestra de suelo en el suelo contaminado antes (SC) y después de someterlo a los diferentes tratamientos de bioestimulación en biopilas.

**Figura 6.** Recuento de bacterias en el suelo contaminado antes (SC) y después de someterlo a los diferentes tratamientos de bioestimulación en terrarios.

**Figura 7.** Cantidad de CO<sub>2</sub> producida en el suelo contaminado antes (SC) y después de someterlo a los diferentes tratamientos de bioestimulación en terrarios.

**Figura 8.** Recuento de bacterias en el suelo contaminado antes (SC) y después de someterlo a los diferentes tratamientos de bioestimulación en biopilas.

**Figura 9.** Cantidad de CO<sub>2</sub> producida en el suelo contaminado antes (SC) y después de someterlo a los diferentes tratamientos de bioestimulación en biopilas.

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Análisis de granulometría por tamizado de las muestras inicial y final de suelo contaminado sometido a los diferentes tratamientos de bioestimulación en terrarios y biopilas.

**Tabla 2.** Significación estadística de los análisis paramétricos (ANOVA: F) y no paramétricos (Kruskal-Wallis: H) realizados para la comparación entre tratamientos de bioestimulación en terrarios y biopilas.

**Tabla 3.** Significación estadística del análisis comparativo (Prueba T para muestras dependientes) de las muestras de suelo tras ser sometidas a los diferentes tratamientos de bioestimulación con respecto a la muestra inicial en terrarios y biopilas. **Tabla 4.** Promedio y desviación estándar de las variables fisicoquímicas de las muestras inicial y final de suelo contaminado con hidrocarburos sometido a los diferentes tratamientos de bioestimulación en terrarios y biopilas.

**Tabla 5.** Promedio y desviación estándar de los recuentos de bacterias y hongos de las diferentes diluciones de muestra inicial y final de suelo contaminado sometido a los diferentes tratamientos de bioestimulación en terrarios y biopilas.

## LISTA DE ANEXOS

**Anexo 1.** Tratamientos establecidos, de acuerdo con las condiciones óptimas para la producción de exopolisacáridos en *Pseudomonas* (González, 2019), *Azotobacter* (Molina, 2020), *Rhizobium* (Zaldumbide, 2020) y *Bacillus* (Ortega, 2022).

**Anexo 2.** Comparaciones paramétricas y no paramétricas con resultados post hoc entre tratamientos de bioestimulación de la fase de terrarios en SPSS.

**Anexo 3.** Comparaciones paramétricas y no paramétricas con resultados post hoc entre tratamientos de bioestimulación de la fase de biopilas en SPSS.

## 1. RESUMEN

El alto impacto ambiental de los derrames anuales que se generan de las industrias petroleras ecuatorianas constituye uno de los problemas más grandes de contaminación ambiental, con las provincias amazónicas como las más afectadas por estos incidentes. La constante lucha por la conservación de la biodiversidad de los suelos arcillosos que resultan contaminados ha incrementado el uso y el desarrollo de nuevas técnicas de biorremediación para su recuperación. La bioestimulación es uno de los tratamientos más efectivos, que resulta ambientalmente seguro y económico, para mejorar la estructura de los suelos contaminados mediante la adición de nutrientes o sustratos que estimulen el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos autóctonos de las zonas impactadas. En el presente trabajo, se evaluó la técnica de bioestimulación como una estrategia de modificación de la estructura de suelos arcillosos contaminados con hidrocarburos acumulados en biopilas para su biorremediación. Se determinaron los mejores tratamientos en base a las características fisicoquímicas de los suelos, la actividad respiratoria de la microbiota autóctona y el recuento de los microorganismos presentes en el suelo tras los tratamientos de bioestimulación en terrarios y, posteriormente, se escaló a los mejores hasta biopilas piloto. El tamaño de las partículas y sus agregados se analizaron al inicio y al final del experimento mediante la técnica de granulometría para identificar los cambios estructurales conseguidos. Como resultado, en fase de terrarios, se obtuvo a *Rhizobium* y *Bacillus* como los tratamientos de bioestimulación más interesantes a evaluar en función de los parámetros densidad aparente, porcentaje de espacio poroso, espacio libre o gas, producción de CO<sub>2</sub> y recuento de bacterias, que mostraron cambios significativos como para su escalamiento a biopilas. En esta fase, los niveles de TPH registraron una disminución por efecto de la aplicación de los tratamientos de bioestimulación. En términos generales, se registró un aumento de la población microbiana y su actividad metabólica en los suelos en estudio y se produjo un cambio mínimo en la estructura de estos en función de algunos de los aspectos fisicoquímicos analizados.

Palabras clave: bioestimulación, biopilas, granulometría, hidrocarburos, recuentos.

## 1. ABSTRACT

The high environmental impact of the annual spills generated by Ecuador's oil industries is one of the biggest environmental pollution problems. The Amazonian provinces are the most affected by these incidents. The constant struggle for the conservation of the biodiversity of contaminated clay soils has increased the use and the development of new bioremediation techniques for their recovery. Biostimulation is one of the most effective, environmentally safe and economical treatments to improve the structure of contaminated soils by adding nutrients or substrates that stimulate the growth and metabolic activity of native microorganisms. In the present work, the biostimulation technique was evaluated as a strategy for modifying the structure of clay soils contaminated with hydrocarbons accumulated in biopiles for bioremediation. The best treatments were determined based on the physicochemical characteristics of the soils, the respiratory activity of the indigenous microbiota and the count of microorganisms present in the soil after the biostimulation treatments in terrariums and, subsequently, scaled up to a pilot biopile level. Soil particle size and aggregates were analyzed at the beginning and at the end of the experiment using the granulometry technique to identify the structural changes achieved. As a result, in the terrarium phase, *Rhizobium* and *Bacillus* were the most interesting biostimulation treatments to evaluate according to the parameters bulk density, percentage of pore space, free space or gas, CO<sub>2</sub> production and bacterial counts, which showed significant positive changes and were chosen to scale up to biopiles. In this phase, TPH levels decreased as a result of the application of the biostimulation treatments. In general terms, there was an increase in the microbial population and its metabolic activity in the soils under study, and there was a minimal change in their structure according to some of the physicochemical aspects analyzed.

Key words: biopiles, biostimulation, granulometry, hydrocarbons, counts.

### 3. INTRODUCCIÓN

El crecimiento de la industria petroquímica incrementa productos y desechos derivados de los procesos de producción masiva que, lastimosamente, aumentan el riesgo de derrames y otras afecciones ambientales (Galindo y Rueda, 2012; Suárez, 2013). Según datos del Ministerio de Medio Ambiente y Agua, se han reportado oficialmente 1169 derrames entre 2005 y 2015 en Ecuador. De esos, el 81% corresponden a la Amazonía ecuatoriana (Pontes, 2020). La contaminación ambiental generada por los hidrocarburos derivados del petróleo se traduce en el deterioro de las condiciones naturales de los suelos.

El alto impacto ambiental de los derrames anuales de las industrias petroleras ecuatorianas constituye uno de los problemas más grandes de contaminación ambiental (Naranjo, 2017). Las provincias amazónicas, que son las más afectadas por accidentes petroleros, se ven inmersas en una constante lucha por la conservación de la biodiversidad de los suelos arcillosos que resultan contaminados (Alier, Walter, Di Pierri, Fontaine y Herrero, 2008). De hecho, en 2014, Petroamazonas EP (actual EP PETROECUADOR) desarrolló una propuesta para rehabilitar y reparar los daños ocasionados en el ambiente décadas atrás. Desde entonces, con el proyecto “Amazonía Viva” (PAV) se han alcanzado importantes hitos como la descontaminación de más de 1.5 millones de metros cúbicos de suelo en sitios denominados “CGP” (Centros de Gestión de Pasivos) y la eliminación de 1232 fuentes de contaminación (EP PETROECUADOR, 2023).

La biorremediación como alternativa que emplea la actividad de microorganismos, como actinomicetos, hongos y bacterias para la degradación de hidrocarburos, puede aplicarse de diversas maneras. De acuerdo con Calvache (2015), Campaña (2016) y la FAO (2009), la estructura de los suelos arcillosos está caracterizada, principalmente, por su tendencia a formar agregados de consistencia dura y firme a partir de las partículas de suelo. La compactación de estos agregados se evidencia en la falta de porosidad del suelo, poca oxigenación y escaso crecimiento microbiano (Buendía, 2012). Además, la gran capacidad de retención de agua, la mala aireación y la poca permeabilidad resultante impiden el desarrollo de los microorganismos autóctonos con capacidad biodegradadora. Se debe agregar que los suelos contaminados por hidrocarburos representan un reto adicional para la biorremediación, debido precisamente a la estructura de los suelos de característica arcillosa (Galindo y Rueda, 2012).

La necesidad de plantear una alternativa a la costosa estrategia de aireación mecánica para modificar la estructura de los suelos contaminados con hidrocarburos surge a partir de la baja rentabilidad de las técnicas empleadas. Estas requieren de recursos humanos, financieros y de maquinaria especializada que, inclusive, resultan potencialmente invasivos con la naturaleza (Brutti, Beltrán y García de Salamone, 2018).

La formación de biopilas es un método efectivo de biorremediación (Iturbe, Flores, Chávez y Roldán, 2002). Su función es disminuir las concentraciones de hidrocarburos presentes en el suelo mediante un proceso biológico controlado. La técnica consiste en la formación de pilas de suelo contaminado y material degradable para reducir la concentración de contaminantes derivados del petróleo. En el fondo de las pilas, se coloca un aislante para el control de lixiviados y su aireación puede ser activa, por volteo mecánico de la pila, o pasiva, mediante tubos perforados de aireación con distribución permanente de nutrientes, microorganismos y aire (Suárez, 2013). Sin embargo, las bajas tasas de biorremediación de los suelos arcillosos en biopilas generan la necesidad de instaurar un método efectivo para cambiar, en primera instancia, las condiciones características de estos suelos (Cabanillas y Pissani, 2015).

La bioestimulación es uno de los tratamientos más efectivos que resulta ambientalmente seguro y económico, para mejorar la estructura de los suelos contaminados con hidrocarburos, compuestos mayoritarios del petróleo (50-98%) (Cabanillas y Pissani, 2015). De hecho, actualmente, se ha incrementado el uso de técnicas de biorremediación como ésta para la recuperación de suelos contaminados en biopilas (Cando, 2011). Se basa en la adición de nutrientes o sustratos que estimulen el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos autóctonos de las zonas afectadas, para mejorar la estructura y agregación de las partículas del suelo (Cabanillas y Pissani, 2015).

Por su parte, la bioaugmentación tiene como fundamento la adición a la matriz contaminada de masas microbianas exógenas y endógenas, previamente identificadas, para obtener una recuperación considerable del suelo original, modificar su estructura e influir directamente en la mejora de su textura arcillosa (Bermúdez, 2012; Gómez, Gaviria y Cardona, 2009). En contraste, la bioestimulación se limita a proveer condiciones idóneas (nutrientes o sustratos) que estimulen el crecimiento y la actividad metabólica de ciertos

microorganismos ya existentes en el suelo contaminado, que puedan actuar como potenciadores de remediación (Bermúdez, 2012).

Cando (2011) y Ciancaglini (2010) mencionan que las propiedades físicas y químicas de los suelos contaminados como textura, pH y permeabilidad son factores que deben considerarse para la aplicación de diferentes tratamientos de biodegradación. En ese sentido, una de las formas en que la estructura del suelo puede acondicionarse para facilitar procesos de biorremediación constituye la producción de exopolisacáridos (EPS) (Naranjo, 2017). Los EPS son biopolímeros capaces de interactuar con partículas de arcilla para formar micro y macro agregados de suelo que favorecen la permeabilidad y evitan la desecación de las partículas de arcilla (Chenu, 1993).

Justamente, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Rhizobium* y *Bacillus* son géneros bacterianos destacados por su capacidad de producir EPS como producto de su metabolismo secundario (Mathews et al., 2013). Además, se han estudiado con detenimiento las condiciones que favorecen la optimización de su producción en suelos contaminados con hidrocarburos (González, 2019; Molina, 2020; Zaldumbide, 2020; Ortega, 2022). Por ello, resultan atractivos para iniciativas enfocadas en el cambio de estructura de suelo como estrategia para agilizar procesos de biorremediación.

Al conseguir una mejora real de la estructura de los suelos afectados por los derivados del petróleo, los porcentajes de degradación de hidrocarburos mejorarían considerablemente (Cabanillas y Pissani, 2015). Por tanto, esta investigación podría haber resultado beneficiosa en términos de velocidad de remediación que, a su vez, derivaría en disminución de la contaminación ambiental y la reducción del impacto socio ecológico producido por los hidrocarburos. La simulación de las condiciones óptimas para la producción de EPS por microorganismos de suelos arcillosos contaminados por hidrocarburos (González, 2019; Molina, 2020; Zaldumbide, 2020; Ortega, 2022) y la comprobación de los efectos de su bioestimulación en la estructura de suelos en terrarios y biopilas, permitió disponer de una alternativa de mejora de la estructura de este tipo de suelos. De esta manera, la aceleración de otros procesos de biorremediación y el avance en el estudio de microorganismos o consorcios microbianos ya presentes en un medio contaminado factibilizarían, potencialmente, solventar el problema de la remediación lenta (Ruiz, 2019; Suárez, 2013).

En el país, la caracterización de microorganismos con capacidad de degradar hidrocarburos para tratamientos de biorremediación o técnicas que permitan maximizar las tasas de recuperación de suelos es limitada (Beristaín, 2009; Naranjo, 2017). Por ello, se planteó este estudio analítico del método de bioestimulación enfocado en fomentar la producción de EPS en terrarios y biopilas de suelos contaminados con hidrocarburos, como estrategia que permitiera mejorar la estructura de suelos y constituyera una verdadera alternativa para acelerar los tratamientos de biorrecuperación (Naranjo, 2017).

### **3.1. OBJETIVOS**

#### **3.1.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la bioestimulación como estrategia de modificación de la estructura de suelos arcillosos contaminados con hidrocarburos, acumulados en biopilas para su biorremediación.

#### **3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar cuál de las estrategias de bioestimulación previamente establecidas para la optimización de la producción de exopolisacáridos por parte de *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Rhizobium* y *Bacillus* consigue, a nivel de terrarios, el mejoramiento de la estructura del suelo arcilloso contaminado con hidrocarburos independientemente de los microorganismos presentes en él.

Evaluar, a nivel de biopilas, la efectividad de la exposición de los microorganismos del suelo contaminado a condiciones óptimas para la excreción de EPS en el cambio de la estructura edáfica.

### **3.2. HIPÓTESIS**

Al menos una de las estrategias de bioestimulación evaluadas tiene el potencial de mejorar la estructura de suelo sin afectar la biodisponibilidad de los hidrocarburos presentes y, con ello, puede contribuir a la potenciación de procesos de biorremediación.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Área de estudio

El suelo utilizado en esta investigación provino del CGP 184 ubicado en el cantón Joya de los Sachas, provincia de Orellana, donde se acopian lotes de suelo contaminado provenientes de las distintas fuentes de contaminación que se encuentran en intervención por parte del PAV. Las biopilas que se manejan para los procesos de biorremediación se distribuyen en forma de trapecio, donde la base inferior mide cerca de 4 m; la base superior, 2 m; el largo ocupa entre 50 y 80 m y, generalmente, alcanzan 2 m de altura. Con estas dimensiones, el volumen de suelo promedio que se acopia está entre los 300 y 400 m<sup>3</sup> (Efficãcitas, 2021).

En los CGP cercanos al Bloque 60 Sacha, ubicado a 254 msnm, las condiciones climáticas anuales rodean los 25 °C de temperatura media, se registra en promedio un 94% de humedad relativa y un aproximado de 507 mm de precipitaciones al año (Efficãcitas, 2021).

### 4.2. Toma de muestras

Para el muestreo de suelo por parte del personal del PAV, se hicieron modificaciones al protocolo de Escalante (2002). De esta manera, se obtuvo una muestra compuesta de 60 kg de suelo contaminado que fue recolectado de las biopilas, ubicadas en el Bloque 60-Sacha, que permanecen en proceso de biorremediación.

La muestra compuesta obtenida fue enviada en forma de submuestras, colocadas en bolsas herméticas estériles, para su transportación en oscuridad y frío para mantener la humedad hasta el laboratorio de Microbiología del Campus Nayón de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE). Una vez en el laboratorio, se reconstituyó la muestra compuesta, se la pulverizó y homogenizó. Los 60 kg fueron distribuidos en 18 terrarios, como indica la Figura 1, entre seis tratamientos por triplicado: Control, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Bacillus* y Combinado, en función de las mejores condiciones para bioestimular la producción de EPS por los géneros bacterianos

potencialmente implicados (Anexo 1). Se reservaron, además, 3 kg de material edáfico homogenizado para determinar, por triplicado, sus condiciones fisicoquímicas y microbiológicas iniciales y 3 kg extra para determinar su composición por tamaño de partículas mediante granulometría, también por triplicado. Tras los ensayos de bioestimulación, se repitieron por triplicado los análisis fisicoquímicos, microbiológicos y de granulometría del suelo de cada tratamiento a partir de muestras de 1 kg del suelo.



**Figura 1.** Diseño experimental con la distribución y composición de los tratamientos en fase de terrarios. Tiempo de duración, frecuencia de aplicación de tratamientos y riego.

Para la fase de biopilas o experimentación en campo, el suelo fue obtenido, homogenizado y distribuido por personal del PAV de EP PETROECUADOR con ayuda de maquinaria pesada. El equipo se encargó de ubicar las biopilas piloto en la plataforma de escalamiento de las instalaciones del Bloque 60, donde se llevó a cabo la aplicación de los tratamientos de bioestimulación y su respectivo monitoreo (Figura 2).



**Figura 2.** Diseño experimental con la distribución y composición de los tratamientos en fase de biopilas. Tiempo de duración, frecuencia de aplicación de tratamientos y riego.

### 4.3. Análisis fisicoquímicos del suelo contaminado

Para evaluar las condiciones fisicoquímicas de los suelos contaminados con hidrocarburos, se tomaron en cuenta las siguientes variables: densidad real, densidad aparente, porcentaje de espacio poroso, permeabilidad, saturación de petróleo, saturación de agua y espacio libre o gas (Flores y Alcalá, 2010). El análisis de estos factores se realizó tanto a la llegada de las muestras de suelo como al finalizar los ensayos en terrarios y biopilas, para comprobar si se produjeron cambios en la estructura del suelo en los diferentes tratamientos de bioestimulación bajo análisis. El Centro de Investigación Quito (CIQ) de EP PETROECUADOR proporcionó estos resultados. Por otro lado, los análisis de granulometría se llevaron a cabo en el Laboratorio de Resistencia de Materiales, Mecánica de Suelos, Pavimentos y Geotécnica de la PUCE, según el protocolo establecido por la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM, por sus siglas en inglés) (2017).

Se realizó también una medición de la biodisponibilidad de los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) para los ensayos en campo, para determinar el grado en el que estos compuestos químicos estuvieron presentes en la matriz de suelo y pudieron ser absorbidos, metabolizados o se encontraron disponibles para la interacción con sistemas biológicos (Gómez, 2003). Estos datos fueron proporcionados por el Centro de Investigación de

Tecnologías Ambientales del Proyecto Amazonía Viva (CITGAV) de EP PETROECUADOR y se realizaron, también, antes y después de la aplicación de los tratamientos de bioestimulación establecidos.

#### **4.4. Recuento de bacterias y hongos**

Se realizó un recuento total en placa de hongos y bacterias que se encontraban en las muestras de suelo contaminado antes de iniciar los tratamientos de bioestimulación y al finalizar el experimento. De esta manera, se pudo determinar si se produjeron cambios entre la población microbiana inicial y final.

Para el recuento bacteriano, se partió de una muestra de 10 g de suelo contaminado tanto antes como después de la aplicación de los tratamientos. De acuerdo con el protocolo planteado por Bottomley, Angle y Weaver (2020), la muestra de suelo pesada fue diluida en 90 ml de agua peptonada al 0,1%, llevada a agitación en vórtex y, a partir de la solución obtenida, se realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta la dilución  $10^{-6}$ . Las diluciones  $10^{-4}$  hasta  $10^{-6}$  fueron sembradas en superficie con asa de Drigalsky en Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI, por sus siglas en inglés) y llevadas a incubación a 27 °C por 48 horas. Después del período de incubación, se observaron las placas en busca de colonias con morfología característica bacteriana y se realizó el recuento tanto a las 24 como a las 48 horas.

Por otro lado, para el recuento de hongos, se partió de una muestra de 10 g de suelo contaminado diluida en 90 ml de Tween 80% y llevada a agitación en vórtex. A continuación, se realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta la dilución  $10^{-4}$ . A partir de las tres últimas diluciones, se realizaron siembras en superficie con asa de Drigalsky en Agar Rosa de Bengala y fueron llevadas a incubación durante siete días a 27 °C. Posteriormente, se observaron colonias con morfología característica de hongos y levaduras para su respectivo registro cada 24 horas por un periodo de siete días (Sylvia, Fuhrmann, Hartel y Zuberer, 2005).

#### 4.5. Respiración de suelo

Como resultado de la degradación de sustratos orgánicos que estuvieron presentes en el suelo, al igual que los nutrientes que fueron incorporados por cada tratamiento, se produjo una cantidad determinada de dióxido de carbono que dependió directamente de la microflora predominante en el medio, así como también factores climáticos y edáficos. Naturalmente, el suelo poseía una determinada comunidad microbiana que produjo dióxido de carbono, independientemente de la vía metabólica y las condiciones aeróbicas a las que estuvo sometido (Sylvia et al., 2005). La cantidad de dióxido de carbono producido permitió medir la actividad global de la flora microbiana presente en el suelo de acuerdo con las condiciones de bioestimulación experimentadas.

Para este análisis, según el protocolo de González et al. (2021) con modificaciones, se partió de una submuestra de 25 g de la muestra de suelo original (para el análisis inicial) y las muestras de suelo obtenidas de cada terrario y biopila al finalizar el periodo de experimentación (para el análisis final). A estas se les agregó nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) al 0,025% y, con un atomizador, se debió humedecer el suelo hasta un 60 – 70 % de su capacidad de campo. Posteriormente, se transfirió el suelo tratado a un frasco de 1L de capacidad y, sobre su superficie, se colocó un vaso de precipitado o frasco pequeño con 15 ml de hidróxido de sodio (NaOH) 0,5 N. Se cerraron los frascos herméticamente y se los llevó a incubación a 27 °C o a temperatura ambiente durante siete días.

Transcurrida una semana, se determinó la cantidad de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) producido mediante titulación. Con los datos obtenidos, se aplicó la fórmula:

$$mg \text{ de } C \text{ o } \text{CO}_2 = (B - V) NE$$

donde  $B$  es el volumen (ml) de ácido requerido para titular el NaOH del control absoluto;  $V$  es el volumen (ml) de ácido requerido para titular el NaOH del suelo tratado;  $N$  la normalidad del ácido y  $E$ , la constante de peso equivalente con la que se pudieron expresar los datos en función de  $C$  ( $E = 6$ ) o  $\text{CO}_2$  ( $E = 22$ ) que se produjeron.

#### 4.6. Montaje del ensayo

El modelo matemático utilizado en la aplicación de los tratamientos fue el Diseño Completamente al Azar (DCA), cuyos requisitos se adecúan a la investigación experimental

(Buendía, 2012). En fase de terrarios, por cada uno de estos, se utilizaron 3 kg de suelo contaminado con hidrocarburos proveniente de la muestra compuesta de las biopilas de origen para cada tratamiento por triplicado, con un control o testigo con suelo contaminado para obtener resultados estadísticamente significativos (Sánchez-Otero, 2016). Es decir, los tratamientos establecidos en condiciones de laboratorio fueron cinco más el testigo, cada uno por triplicado, con el terrario como unidad experimental.

Por otro lado, en fase de biopilas, se montaron grupos de tierra de aproximadamente  $1 \text{ m}^3$  con el mismo volumen de suelo contaminado con hidrocarburos, donde se formaron biopilas para los dos mejores tratamientos obtenidos en la fase de terrarios (*Rhizobium* y *Bacillus*), con un control o testigo con suelo contaminado para obtener resultados estadísticamente significativos (Sánchez-Otero, 2016). En otras palabras, se evaluaron a nivel de biopilas los dos mejores tratamientos obtenidos en la fase de terrarios más el testigo, cada uno por triplicado, con la biopila como unidad experimental (Figura 3).



**Figura 3.** Distribución aleatoria de las biopilas con cada tratamiento de bioestimulación por triplicado en la plataforma de escalamiento del campo Sacha, Bloque 60 de EP PETROECUADOR.

Para los ensayos en campo, se diseñó un sistema de aireación con tubería que se colocó dentro de las biopilas piloto para favorecer el paso de aire y tener una mejor distribución de los nutrientes al aplicar los tratamientos de bioestimulación. De esta manera, se aseguró que el suelo de las unidades experimentales y los resultados de las muestras analizadas no se vean alterados por la experimentación y la aplicación de tratamientos en los ensayos estáticos en campo (Figura 4).



**Figura 4.** Sistema de aireación por tuberías de Policloruro de Vinilo (PVC) para ensayos estáticos en campo.

En las condiciones originales determinadas para cada género microbiano, se tenía un control completo sobre el pH y la temperatura de los suelos analizados. Sin embargo, para la bioestimulación en biopilas, se debió trabajar en condiciones ambientales donde estos factores, que dependen de la concentración de agua, debieron mantenerse en relación constante y tan baja como fuera posible para no ser alterados (Fernández et al., 2006). Por esta razón, se aplicaron modificaciones en las condiciones óptimas de crecimiento previamente establecidas, en cuanto a pH y temperatura, de los tratamientos de bioestimulación a nivel de terrarios.

Además, fue importante considerar que los microorganismos requieren de humedad (una concentración alta de agua) para transportar sus nutrientes, desarrollar sus procesos metabólicos y mantener su estructura celular. Por tanto, los terrarios, al igual que las biopilas, se rociaron con agua cada dos o tres días, para evitar un exceso de humedad en el suelo. Esto fue deseable porque se ocuparía el poco espacio poroso disponible entre las partículas de arcilla, lo que alteraría constantemente la temperatura y el pH, limitaría la permeabilidad del aire y reduciría la eficiencia de la aireación (Fahnestock, 1998).

#### **4.7. Análisis estadísticos**

Se utilizó un Diseño Completamente Aleatorio (DCA) como herramienta de organización de la aplicación de tratamientos y análisis estadístico para determinar cuál de las formulaciones de bioestimulación analizadas presentó una mejora sustancial en la estructura del suelo arcilloso contaminado con hidrocarburos a nivel de terrarios y biopilas.

Se utilizó la herramienta de análisis estadístico IBM SPSS Statistics para análisis paramétricos como el ANOVA de un factor y las pruebas no paramétricas como la de Kruskal Wallis para detectar diferencias significativas entre tratamientos, al igual que las pruebas post-hoc de Tukey y su equivalente no paramétrico respectivo (Sánchez-Otero, 2016). El tipo de análisis estadístico a realizarse lo determinó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de los datos.

## 5. RESULTADOS

En las Tablas 1 a 6, se muestran los resultados de los análisis fisicoquímicos obtenidos por parte del Laboratorio de Resistencia de Materiales, Mecánica de Suelos, Pavimentos y Geotécnica de la PUCE, el CITGAV y el CIQ de EP PETROECUADOR, además de los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos realizados en el Laboratorio de Microbiología Agrícola del Campus PUCE Nayón.

De acuerdo con los resultados de granulometría y caracterización fisicoquímica de las muestras iniciales de suelo contaminado con hidrocarburos, el suelo sujeto a experimentación tanto en terrarios como en biopilas se compuso, en su mayoría, por gránulos finos, con porcentajes medios de partículas de arena y valores bajos de partículas de grava (Tabla 1). Estas características se ajustan a un suelo de textura fina a media, también llamado limo arcilloso (ASTM, 2020).

**Tabla 1.** Análisis de granulometría por tamizado de las muestras inicial y final de suelo contaminado sometido a los diferentes tratamientos de bioestimulación en terrarios y biopilas.

Fase	Muestra	Tratamiento	Arena (%)		Finos (%)		Grava (%)	
			$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
Terrarios	Inicial	SC	28.00	-	71.00	-		
	Final	Control	33.00	6.56	67.00	6.56		
		<i>Pseudomonas</i>	28.33	0.58	71.67	0.58		
		<i>Azotobacter</i>	39.33	1.15	60.67	1.15		
		<i>Rhizobium</i>	38.33	0.58	61.67	0.58		
		<i>Bacillus</i>	37.33	2.31	62.67	2.31		
		Combinado	34.33	4.16	65.67	4.16		
Biopilas	Inicial	SC	51.00	0.00	47.50	0.71	1.50	0.71
	Final	Control	30.33	2.89	69.00	3.61	1.00	1.73
		<i>Rhizobium</i>	30.33	1.53	69.33	1.53	0.00	0.00
		<i>Bacillus</i>	29.33	3.79	68.33	0.58	2.33	3.21

$\bar{x}$ , promedio;  $\sigma$ , desviación estándar; SC, suelo contaminado.

En terrarios y biopilas, se registraron porcentajes similares de gránulos finos, arena y grava en el suelo sometido a los diferentes tratamientos de bioestimulación (Tablas 1 y 2), sin que se produjeran cambios granulométricos perceptibles entre antes y después de la aplicación de los tratamientos, salvo para los tratamientos *Azotobacter*, *Rhizobium* y *Bacillus* (Tabla 3). Sin embargo, para los parámetros arena y finos en fase de biopilas, se detectaron diferencias con respecto a la muestra contaminada inicial en todos los tratamientos aplicados incluido el control. En el caso de las partículas de grava, tras la experimentación en terrarios, no se encontraron partículas de grava en los análisis granulométricos; mientras que en las biopilas sí se hallaron, pero no se registraron diferencias significativas en el suelo entre antes y después de someterse a los tratamientos de bioestimulación (Tabla 3).

**Tabla 2.** Significación estadística de los análisis paramétricos (ANOVA: F) y no paramétricos (Kruskal-Wallis: H) realizados para la comparación entre tratamientos de bioestimulación en terrarios y biopilas.

Parámetro analizado	Terrarios		Biopilas	
	Estadístico comparativo	Significancia	Estadístico comparativo	Significancia
Arena <sup>1</sup>	H	0.12	H	0.85
Finos <sup>2</sup>	H	0.12	H	0.72
Grava <sup>3</sup>	-	-	H	0.28
$\rho_a$ <sup>4</sup>	H	0.01	F	0.81
$\rho_r$ <sup>5</sup>	H	0.08	F	0.10
$\Phi$ Efectiva <sup>6</sup>	H	0.01	F	0.50
K <sup>7</sup>	F	0.08	F	0.10
So <sup>8</sup>	H	0.07	H	0.07
Sw <sup>9</sup>	F	0.00	H	0.05
Sa <sup>10</sup>	F	0.00	H	0.04
Rh <sup>11</sup>	H	0.17	H	0.03
Rb <sup>12</sup>	H	0.02	F	0.00
CO <sub>2</sub> <sup>13</sup>	F	0.03	H	0.08
TPH <sup>14</sup>	-	-	F	0.69

1, partículas de arena; 2, partículas de finos; 3, partículas de grava; 4,  $\rho_a$ : densidad aparente; 5,  $\rho_r$ : densidad real; 6,  $\Phi$  Efectiva: espacio poroso; 7, K: permeabilidad; 8, So: saturación de petróleo; 9, Sw: saturación de agua; 10, Sa: espacio libre o gas; 11, Rh: Recuento de hongos; 12, Rb: Recuento de bacterias; 13, CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono; 14, TPH: Hidrocarburos Totales de Petróleo.

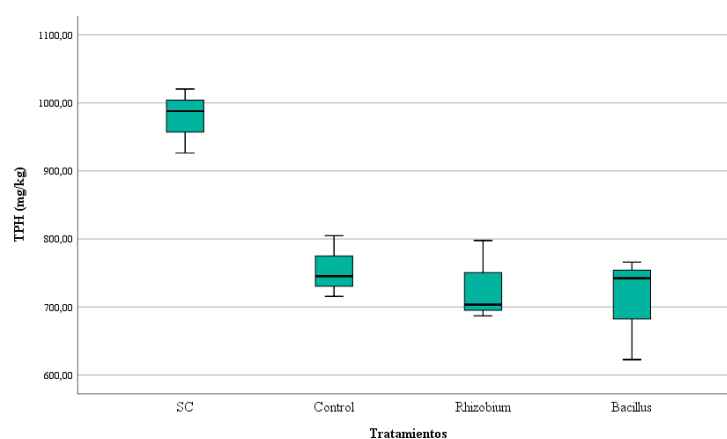
Por otro lado, las muestras de suelo analizadas demostraron poseer altos niveles de TPH (Tabla 4). Hubo una reducción en la contaminación entre antes y después de la aplicación de los tratamientos de bioestimulación, desde niveles de 978.24 +/- 47.77 mg/kg de la muestra inicial hasta 710.27 +/- 76.81 mg/kg en el caso del tratamiento *Bacillus* (Tabla

4), aunque no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos de bioestimulación ensayados (Figura 5, Tabla 2).

**Tabla 3.** Significación estadística del análisis comparativo (Prueba T para muestras dependientes) de las muestras de suelo tras ser sometidas a los diferentes tratamientos de bioestimulación con respecto a la muestra inicial en terrarios y biopilas.

Parámetro	Terrarios						Biopilas		
	Control	<i>Pseudomonas</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Bacillus</i>	Combinado	Control	<i>Rhizobium</i>	<i>Bacillus</i>
Arena <sup>1</sup>	0.32	0.42	0.00	0.00	0.02	0.12	0.01	0.00	0.01
Finos <sup>2</sup>	0.40	0.18	0.00	0.00	0.03	0.16	0.01	0.00	0.00
Grava <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	0.53	0.06	0.74
$\rho_a$ <sup>4</sup>	0.04	0.01	0.09	0.02	0.86	0.33	0.26	0.26	0.25
$\rho_r$ <sup>5</sup>	0.00	0.43	0.45	0.19	0.16	0.46	1.00	0.27	0.08
$\Phi$ Efectiva <sup>6</sup>	0.02	0.00	0.01	0.68	0.86	0.14	0.30	0.33	0.59
K <sup>7</sup>	0.06	0.21	0.84	0.30	0.51	0.38	0.05	0.11	0.02
So <sup>8</sup>	0.10	0.10	0.13	0.08	0.11	0.09	0.26	0.34	0.01
Sw <sup>9</sup>	0.03	0.01	0.01	0.04	0.04	0.03	0.02	0.05	0.01
Sa <sup>10</sup>	0.09	0.00	0.00	0.48	0.06	0.02	0.00	0.07	0.01
Rh <sup>11</sup>	-	0.03	0.36	-	0.33	0.45	0.03	0.17	0.01
Rb <sup>12</sup>	0.02	0.01	0.11	0.02	0.22	0.01	0.12	0.02	0.06
CO <sub>2</sub> <sup>13</sup>	0.59	0.03	0.00	0.33	0.01	-	0.08	0.00	0.00
TPH <sup>14</sup>	-	-	-	-	-	-	0.01	0.01	0.04

1, partículas de arena; 2, partículas de finos; 3, partículas de grava; 4,  $\rho_a$ : densidad aparente; 5,  $\rho_r$ : densidad real; 6,  $\Phi$  Efectiva: espacio poroso; 7, K: permeabilidad; 8, So: saturación de petróleo; 9, Sw: saturación de agua; 10, Sa: espacio libre o gas; 11, Rh: Recuento de hongos; 12, Rb: Recuento de bacterias; 13, CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono; 14, TPH: Hidrocarburos Totales de Petróleo.



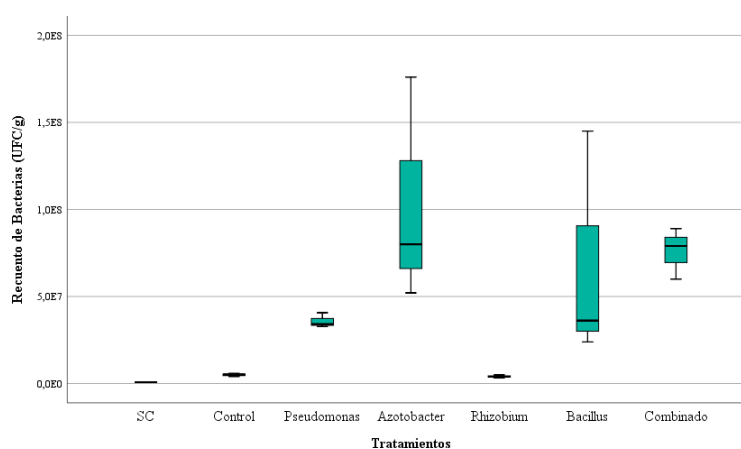
**Figura 5.** Niveles de TPH de la muestra de suelo en el suelo contaminado antes (SC) y después de someterlo a los diferentes tratamientos de bioestimulación en la biopilas.

**Tabla 4.** Promedio y desviación estándar de las variables fisicoquímicas de las muestras inicial y final de suelo contaminado con hidrocarburos sometido a los diferentes tratamientos de bioestimulación en terrarios y biopilas.

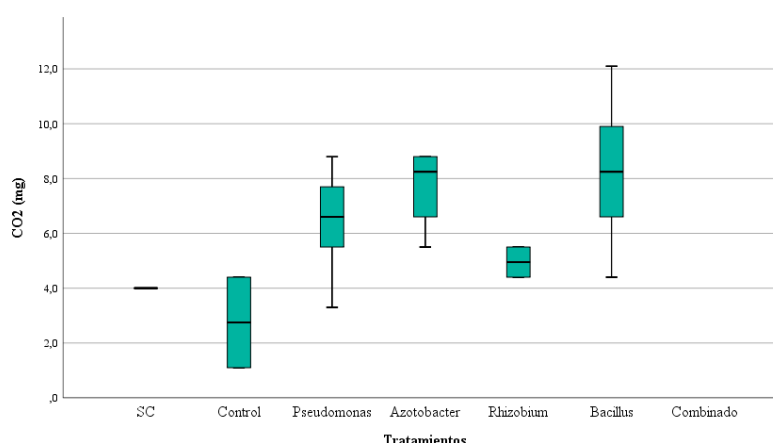
Análisis	Promedio y desviación estándar	Terrarios							Biopilas			
		Inicial		Final					Inicial		Final	
		SC	Control	<i>Pseudomonas</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Bacillus</i>	Combinado	SC	Control	<i>Rhizobium</i>	<i>Bacillus</i>
$\rho_a^1$	$\bar{x}$	1.38	1.53	1.71	1.57	1.29	1.37	1.48	1.35	1.48	1.44	1.44
	$\sigma$	0.06	0.01	0.04	0.08	0.04	0.03	0.13	0.06	0.09	0.11	0.05
$\rho_r^2$	$\bar{x}$	2.63	2.77	2.57	2.55	2.58	2.72	2.69	2.63	2.63	2.67	2.73
	$\sigma$	0.02	0.02	0.09	0.15	0.03	0.07	0.12	0.02	0.03	0.06	0.05
$\Phi$ Efectiva <sup>3</sup>	$\bar{x}$	49.90	44.83	36.09	36.42	50.08	49.69	45.07	48.62	43.79	45.94	47.40
	$\sigma$	1.98	0.76	0.84	1.28	1.37	0.74	2.64	2.56	3.63	4.91	0.96
$K^4$	$\bar{x}$	52708.64	15857.08	57787.68	54439.72	36602.04	64790.77	78710.43	5854.83	17235.01	45133.25	47619.18
	$\sigma$	6563.17	15658.92	4848.41	19270.73	16199.44	26685.40	41988.09	543.92	5260.61	24089.33	11565.99
$S_o^5$	$\bar{x}$	16.84	0.00	1.10	3.06	3.61	0.36	1.20	1.36	12.83	3.33	34.53
	$\sigma$	9.89	0.00	0.76	0.56	3.18	0.59	0.98	0.24	15.69	2.52	4.54
$S_w^6$	$\bar{x}$	15.03	56.93	93.46	79.83	29.71	67.74	58.27	20.33	23.84	44.25	29.96
	$\sigma$	6.67	10.20	5.21	4.64	1.60	13.50	10.55	0.56	16.18	10.55	2.42
$S_a^7$	$\bar{x}$	68.13	43.07	5.44	17.12	66.68	31.90	40.53	78.31	63.33	52.42	35.51
	$\sigma$	4.62	10.20	5.96	5.19	1.82	13.62	11.21	0.58	0.76	12.89	6.57
$CO_2^8$	$\bar{x}$	4.03	2.75	6.60	7.70	4.95	8.25	-	52.25	1.10	3.30	7.70
	$\sigma$	0.00	2.33	1.91	1.39	0.78	2.67	-	7.00	1.56	4.61	2.87
TPH <sup>9</sup>	$\bar{x}$								978.24	755.25	729.35	710.27
	$\sigma$								47.77	45.42	59.78	76.81

$\bar{x}$ , promedio;  $\sigma$ , desviación estándar; SC, suelo contaminado; 1,  $\rho_a$ : densidad aparente expresada en gramos por centímetro cúbico ( $g/cm^3$ ); 2,  $\rho_r$ : densidad real expresada en  $g/cm^3$ ; 3,  $\Phi$  Efectiva: espacio poroso expresado en porcentaje (%); 4,  $K$ : permeabilidad expresada en miliDarcy (mD); 5,  $S_o$ : saturación de petróleo expresado en %; 6,  $S_w$ : saturación de agua expresada en %; 7,  $S_a$ : espacio libre o gas expresado en %; 8,  $CO_2$ : dióxido de carbono expresado en mg, 9, TPH: Hidrocarburos Totales de Petróleo expresados en mg/kg.

Se encontraron diferencias significativas entre el suelo contaminado original y el sometido a experimentación en terrarios, incluido el control, en los parámetros saturación de agua, densidad aparente (salvo los tratamientos *Azotobacter*, *Bacillus* y Combinado), espacio poroso (salvo *Rhizobium* y *Bacillus*) y recuento de bacterias (salvo *Azotobacter* y *Bacillus*; Figura 6) (Tabla 3). La permeabilidad y la saturación de petróleo no evidenciaron cambio alguno. Para espacio libre o gas, los únicos tratamientos en no registrar diferencias fueron el control y *Rhizobium*. Lo mismo sucedió con los tratamientos control, *Rhizobium* y *Bacillus* para espacio libre o gas. Resaltó que solo en el tratamiento control se evidenciaron cambios en densidad relativa y solo *Pseudomonas* tuvo efecto en el recuento de hongos. En lo que respecta a la producción de CO<sub>2</sub>, los cambios no fueron detectables para los tratamientos control y *Rhizobium* (Figura 7).

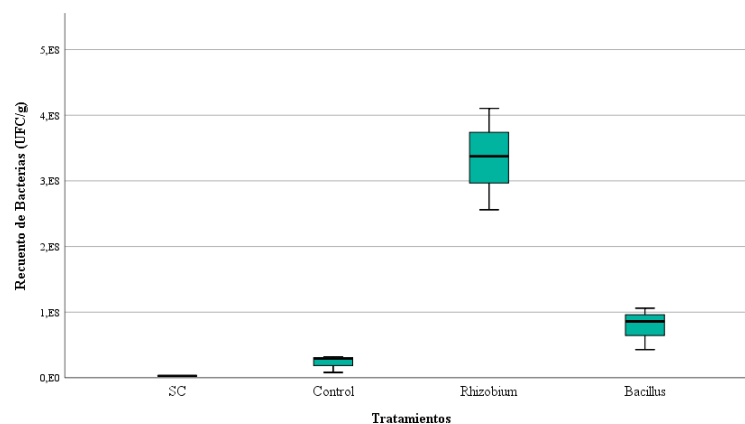


**Figura 6.** Recuento de bacterias en el suelo contaminado antes (SC) y después de someterlo a los diferentes tratamientos de bioestimulación en terrarios.

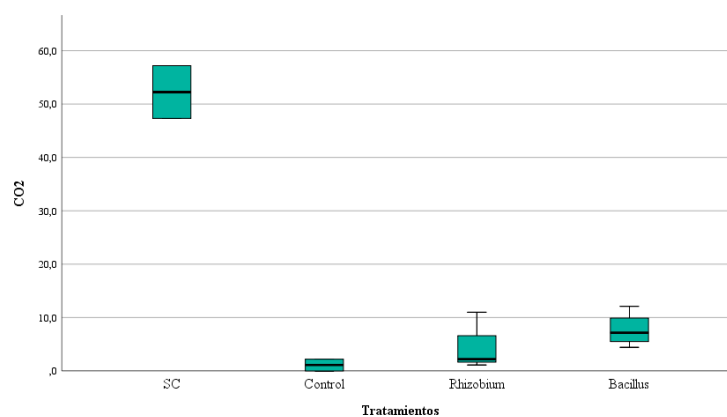


**Figura 7.** Cantidad de CO<sub>2</sub> producida en el suelo contaminado antes (SC) y después de someterlo a los diferentes tratamientos de bioestimulación en terrarios.

En las biopilas, no se registraron diferencias entre tratamientos y el suelo original para los parámetros densidad aparente, densidad real y espacio poroso (Tabla 3). Cambios muy significativos se observaron en saturación de petróleo solo tras el tratamiento *Bacillus* y los tratamientos de bioestimulación sí marcaron una diferencia en el recuento de bacterias (Figura 8) y la producción de CO<sub>2</sub> (Figura 9). Por otra parte, el único tratamiento en no registrar cambios tras la experimentación fue *Rhizobium* en permeabilidad, espacio libre y recuento de hongos (Tabla 3).



**Figura 8.** Recuento de bacterias en el suelo contaminado antes (SC) y después de someterlo a los diferentes tratamientos de bioestimulación en biopilas.



**Figura 9.** Cantidad de CO<sub>2</sub> producida en el suelo contaminado antes (SC) y después de someterlo a los diferentes tratamientos de bioestimulación en biopilas.

En el análisis de resultados tras la experimentación, en la fase de terrarios, al comparar entre tratamientos de bioestimulación (Tablas 2, 4 y 5; Anexo 2), se encontraron

diferencias significativas para los parámetros densidad aparente, saturación de agua, espacio libre o gas, producción de CO<sub>2</sub> (Figura 7) y recuento de bacterias (Figura 6), mientras que para densidad real, porcentaje de espacio poroso, permeabilidad, saturación de petróleo y recuento de hongos no se registraron diferencias.

**Tabla 5.** Promedio y desviación estándar de los recuentos de bacterias y hongos de las diferentes diluciones de muestra inicial y final de suelo contaminado sometido a los diferentes tratamientos de bioestimulación en terrarios y biopilas.

Muestra	Tratamiento	Terrarios				Biopilas			
		Hongos (UFC/g)		Bacterias (UFC/g)		Hongos (UFC/g)		Bacterias (UFC/g)	
		$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
Inicial	SC	$66 \times 10^3$	-	$36 \times 10^5$	$4.0 \times 10^6$	< 100	-	$30 \times 10^5$	-
	Control	< 100	-	$50 \times 10^5$	$9.1 \times 10^5$	$5 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$	$23 \times 10^6$	$1.3 \times 10^7$
Final	<i>Pseudomonas</i>	$90 \times 10^4$	$2.3 \times 10^5$	$36 \times 10^6$	$4.2 \times 10^6$				
	<i>Azotobacter</i>	$36 \times 10^5$	$5.1 \times 10^6$	$10 \times 10^7$	$6.5 \times 10^7$				
	<i>Rhizobium</i>	< 100	-	$40 \times 10^5$	$8.1 \times 10^5$	$86 \times 10^4$	$7.0 \times 10^5$	$33 \times 10^7$	$7.7 \times 10^7$
	<i>Bacillus</i>	$35 \times 10^5$	$4.5 \times 10^6$	$68 \times 10^6$	$6.7 \times 10^7$	$34 \times 10^4$	$1.9 \times 10^5$	$78 \times 10^6$	$3.2 \times 10^7$
	Combinado	$28 \times 10^4$	$4.0 \times 10^5$	$76 \times 10^6$	$1.5 \times 10^7$				

UFC, Unidades formadoras de colonia;  $\bar{x}$ , promedio;  $\sigma$ , desviación estándar; SC, suelo contaminado.

En el análisis de resultados tras la experimentación, en la fase de biopilas, solo los parámetros espacio libre, recuento de bacterias y recuento de hongos registraron diferencias significativas entre los tratamientos de bioestimulación (Tabla 2, 4 y 5; Anexo 3). Con respecto a diferencias entre tratamientos y control, se confirmaron con menor espacio libre para el tratamiento *Bacillus*, con  $78 \times 10^6 \pm 3.2 \times 10^7$  UFC/g en recuento de bacterias (Tablas 4 y 5; Anexo 3) y mayor número de colonias fúngicas y bacterianas en el tratamiento *Rhizobium*, con  $86 \times 10^4 \pm 7.0 \times 10^5$  UFC/g y  $33 \times 10^7 \pm 7.7 \times 10^7$ , respectivamente (Figura 9).

## 6. DISCUSIÓN

Según López (2002), una buena calidad del suelo está determinada por distintos factores químicos, físicos y biológicos que influyen entre sí. Las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas de un suelo están estrechamente relacionadas para mantener un buen funcionamiento del ecosistema interno del suelo, una absorción y retención de nutrientes efectiva, el paso de diferentes componentes a través de éste y su funcionalidad para el uso que se requiera. En este sentido, para mantener una buena estructura del suelo, se espera

mantener bajos ciertos parámetros fisicoquímicos como la densidad aparente, la densidad real y los puntos de saturación. Mientras que, por otro lado, se procura que los factores como la permeabilidad, la porosidad y los espacios vacíos se mantengan cerca de los valores óptimos establecidos para cada uno de estos parámetros. Adicionalmente, para los factores biológicos como actividad microbiana y recuento de microorganismos, es ideal que exista un aumento en la diversidad y cantidad de hongos y bacterias para mantener una buena calidad de suelo (Viñas, 2005; Flores y Alcalá, 2010; Rucks et al., 2004 y INTAGRI, 2017).

### **6.1. Granulometría y textura de suelo**

En este estudio, se observó que, después de dos meses de aplicación de tratamientos de bioestimulación, los porcentajes de partículas finas, arena y grava en el suelo no cambiaron significativamente. La formación de un suelo depende de la interacción de factores naturales y antrópicos que influyen en su textura y granulometría. Algunos de estos incluyen la resistencia del suelo, procesos de meteorización, condiciones ambientales, composición de la roca madre o tipo de suelo, actividades humanas, procesos geológicos y biológicos y el tiempo de evolución u observación (INTAGRI, 2017; Six et al., 2004).

Dicho esto, existen varias razones por las que se podría justificar la falta de cambio aparente en el suelo sujeto a experimentación. Por un lado, los resultados de los tratamientos de bioestimulación pueden variar según el tipo, el propósito y la composición del bioestimulante utilizado. Algunos tienen como objetivo aumentar la actividad microbiana, mientras que otros pretenden tener un impacto en la estructura del suelo (Du Jardin, 2015). En este caso, los tratamientos de bioestimulación utilizados se enfocaron principalmente en estimular la microbiota del suelo para evidenciar una mejora en su estructura. Por esta razón, es posible que los efectos sobre la granulometría no presentaran una alteración evidente, a diferencia de otro estudio en que los bioestimulantes del suelo indujeron un efecto positivo en la estructura del suelo y en la creación de sus agregados (Findura et al., 2022).

Por otra parte, están los factores ambientales como la humedad, la temperatura, el oxígeno y el pH del suelo que influyen directamente en la actividad microbiana y la velocidad de los procesos de agregación del suelo (Six et al., 2004; Torres-Guerrero et al., 2013). Los cambios en la granulometría pueden verse afectados por estos aspectos si las condiciones climáticas no son favorables para la influencia de los bioestimulantes en la

microbiota durante la experimentación. Muchos microorganismos son termo-sensibles de tal forma que los niveles óptimos de temperatura favorecen la actividad microbiana y la formación de agregados, mientras que, en niveles extremos, sus actividades metabólicas pueden resultar inhibidas o limitadas. Por otra parte, una humedad adecuada resulta esencial para la microbiota del suelo. En caso de falta de humedad, se ralentiza la formación y el desarrollo de agregados por efecto de los microorganismos, mientras que por humedad en exceso se produce una compactación del suelo que afecta negativamente en su estructura. La disponibilidad de oxígeno, por su parte, es indispensable para que se lleven a cabo los procesos aeróbicos de la microbiota autóctona y los niveles de pH influyen directamente en la diversidad de una comunidad microbiana y su composición. De esta manera, si las condiciones ambientales no son adecuadas para la proliferación y la actividad de los microorganismos bioestimulados o si estas condiciones limitan la actividad microbiana en general, los cambios en la granulometría y la estructura del suelo podrían no ser tan evidentes a corto plazo (Fahnestock, 1998 y Cabanillas y Pissani, 2015).

Finalmente, es importante destacar que el tiempo de experimentación debe ser el suficiente para detectar cambios significativos en los aspectos analizados. Con frecuencia, las propiedades del suelo cambian lentamente, especialmente en respuesta a tratamientos biológicos. La magnitud del cambio de alguna de estas propiedades depende directamente de la resiliencia del suelo y los procesos restaurativos y degradantes presentes en él (Six et al., 2004; López, 2002). Algunas pueden presentarse a corto plazo y otras en el largo plazo. Es así como los efectos de bioestimulación en la actividad microbiana pueden tardar más tiempo en convertirse en cambios observables en la distribución de partículas del suelo o en su composición granulométrica (López, 2002).

## **6.2. Hidrocarburos totales de petróleo (TPH)**

De acuerdo con la norma de calidad ambiental (Acuerdo Ministerial No. 097-A [2015] del Ministerio del Ambiente), los criterios de calidad del suelo son valores de fondo aproximados (niveles ambientales representativos para un contaminante en el suelo) o límites analíticos de detección para un contaminante presente en el suelo. Para los TPH en esta normativa, se establece que el límite máximo permisible (LMP) para suelos de uso residencial es de 230 mg/kg; para suelos con fines comerciales, 620 mg/kg; para suelos de

uso industrial, 620 mg/kg; y para suelos con fines agrícolas, 150 mg/kg. En fase de biopilas, se observó que las muestras finales de los tratamientos control, *Rhizobium* y *Bacillus* se encontraban entre los 700 y 760 mg/kg de TPH, lo que supera los LMP establecidos en el Acuerdo Ministerial No. 097-A.

Sin embargo, en estas muestras, la cantidad de TPH mostró una disminución aparente como resultado del riego constante y los tratamientos de bioestimulación. Esto podría explicarse por una variedad de procesos, incluida la fotodegradación, la biodegradación, la volatilización o evaporación, la lixiviación y el tiempo de residencia del suelo contaminado (Maldonado, 2003). En la biodegradación, por ejemplo, los microorganismos presentes en el suelo son capaces de metabolizar los hidrocarburos y degradarlos con el tiempo, con lo que disminuyen su concentración en el medio. Al aplicar un riego constante a las biopilas piloto, se estimula la actividad microbiana que requiere de agua para llevar a cabo sus procesos metabólicos como la producción de EPS, la formación de biopelículas, la descomposición de materia orgánica, la fijación de minerales, las interacciones microbianas y el mantenimiento del ciclo de los nutrientes (Umer y Rajab, 2012).

Como se muestra en los resultados del estudio de Maldonado (2003), otra razón por la que la concentración o el nivel de contaminantes en el suelo disminuye es que el agua de lluvia y el riego pueden arrastrar los hidrocarburos disueltos a capas más profundas del suelo o incluso fuera del perfil de este en un proceso llamado lixiviación. Gómez, Gaviria y Cardona (2009), por su parte, mencionan que la atenuación natural también es un método de remediación pasiva que depende de procesos naturales para degradar y reducir los contaminantes en el suelo y el agua subterránea. Este proceso depende de la presencia o ausencia de microorganismos degradantes adecuados, el nivel de oxígeno disuelto, el nivel de nutrientes y la biodisponibilidad de los contaminantes en el medio. Es así como los niveles de TPH de los tratamientos de bioestimulación y el control mostraron una reducción aparente.

La cantidad de estos contaminantes presentes en el suelo únicamente se registró en fase de biopilas porque, al estudiarse en las condiciones ambientales naturales del PAV, se podrían observar la relación y la influencia directa entre los tratamientos de bioestimulación, la actividad microbiana y la degradación de hidrocarburos de los ensayos en campo. En fase

de terrarios, el fin principal fue el evaluar la bioestimulación en función de la mejora estructural del suelo.

### 6.3. Análisis fisicoquímicos

La densidad real ( $\rho_r$ ) corresponde a la masa de partículas de suelo existentes por unidad de volumen, sin contar con los poros (Baridón, 2019). Generalmente, la densidad real de las partículas de suelo es  $2,65 \text{ g/cm}^3$ . Sin embargo, para suelos de arena gruesa es  $2,655 \text{ g/cm}^3$ ; para suelos de arena fina  $2,659 \text{ g/cm}^3$ ; para limo  $2,798 \text{ g/cm}^3$  y para arcilla  $2,837 \text{ g/cm}^3$  (Núñez, 2001). Este fue uno de los aspectos analizados en las condiciones fisicoquímicas de los suelos contaminados, pues influye de manera directa en la porosidad del suelo. Provoca que, a medida que la densidad real aumenta, la porosidad disminuya, lo que resulta en una disminución de la cantidad de espacio disponible para el flujo de agua y aire en el suelo (INTAGRI, 2017).

Los valores obtenidos en el suelo limo arcilloso de esta investigación ( $2,55 - 2,77 \text{ g/cm}^3$ ) resultan dentro del rango de valores óptimos de  $\rho_r$  tanto de suelos arenosos como limosos. Por esta razón, no fue un factor decisivo en esta investigación. Como menciona Castillo (2005), la textura y la composición de las partículas del suelo influyen en los parámetros fisicoquímicos analizados.

Por otra parte, la densidad aparente ( $\rho_a$ ) es un parámetro que representa la masa del suelo por unidad de volumen total, con los espacios porosos incluidos (Pinot, 2000). En los resultados de terrarios, se registraron valores altos de densidad aparente ( $1,53 \pm 0,01$  a  $1,71 \pm 0,04 \text{ g/cm}^3$ ) que, en su mayoría, indican un ambiente pobre para el crecimiento de raíces, menor porosidad, aireación reducida y baja capacidad de infiltración y retención de agua (FAO, 2009; FAO, 2023). Los valores normales para suelos de textura franco arcilloso y arcillo limoso están entre  $1,30$  y  $1,40 \text{ g/cm}^3$  y para suelos arcillosos, entre  $1,20$  y  $1,30 \text{ g/cm}^3$  (Flores y Alcalá, 2010).

En fase de biopilas, se registraron valores dentro del rango óptimo establecido para un suelo limo arcilloso ( $1,44 \pm 0,05$  hasta  $1,48 \pm 0,09 \text{ g/cm}^3$ ). Aun así, este parámetro no resultó definitorio en esta experimentación. Al ser uno de los parámetros analizados con

frecuencia para medir la calidad de los suelos, se sabe que los valores que puede tomar dependen de muchos factores. A diferencia de la densidad real que es más constante, la densidad aparente es altamente variable. A pesar de esta condición, la compactación del suelo, a menudo, se mide por el aumento de los valores de  $\rho_a$  y es considerada una medida eficaz para la fertilidad de los suelos (Vogel y Smith, 2002; Llanes, 2012).

Por otro lado, el porcentaje de espacio poroso ( $\Phi$  Efectiva) se refiere a la proporción de volumen ocupado por los espacios porosos en relación con el volumen total del suelo (Baridón, 2019). Es así como una mayor porosidad indica un mayor volumen de espacios porosos y, por lo tanto, una mayor capacidad para el flujo de agua y aire en el suelo. Según Olson (1985), un valor adecuado permite la retención y el almacenamiento de agua en el suelo, lo que es esencial para procesos biogeoquímicos como la degradación de los hidrocarburos por microorganismos.

En los resultados obtenidos, se evidenciaron valores de porosidad de rango medio a alto (40 a 51%) de  $\Phi$  Efectiva. Flores y Alcalá (2010) señalan los valores óptimos de este factor en función de la clase textural de los suelos. Entre estos, el porcentaje ideal de porosidad en suelos de textura arcillo limosa está en un rango de 49 a 53%; para suelos arcillosos, en valores de 51 a 55%; y para suelos de textura franco arcillosa, de 47 a 54%. Con los rangos señalados, los porcentajes entre 30 y 40% representan una porosidad baja; de 40 a 50%, porosidad media; y de 50 a 60%, porosidad alta.

Sin embargo, a pesar de que este parámetro no registró modificaciones en la experimentación, se conoce que es usado con frecuencia para determinar la calidad de los suelos y asegurar con mayor facilidad sus funciones de captar, almacenar y transportar distintos componentes a través de él. Además, los cambios en el espacio poroso pueden ser causados por compactación o por saturación de los poros con agua (González et al., 2011; Rucks et al., 2004).

La permeabilidad ( $K$ ), por su parte, es la capacidad de un suelo para permitir el flujo de agua o fluidos a través de él (Sarmiento, 2017). En el caso de los suelos arcillosos contaminados con hidrocarburos, la permeabilidad puede reducirse debido a la presencia de los contaminantes. Estos pueden obstruir los poros del suelo y afectar su capacidad de

drenaje. Además, los suelos arcillosos en sí mismos tienen una estructura compacta y una baja permeabilidad inherente (Rivas y Loyola, 2022).

En este aspecto, los valores de 0,0036 a 0,036 cm/h se consideran de permeabilidad baja; de 3,60 a 36,0 cm/h, permeabilidad alta; y valores superiores o iguales a 36,0 cm/h, de permeabilidad muy alta. La permeabilidad definida por la ley de Darcy (factor de conversión: 1 darcy equivalente a 0.831 m/día), establece que los valores óptimos para cada tipo de suelo están entre 0,23 cm/h para suelos franco arcillosos; 0,15 cm/h para suelos de clase franco arcillo limoso; 0,09 cm/h para arcillo limoso y 0,06 cm/h para arcillas (Flores y Alcalá, 2010).

La permeabilidad registrada por el suelo experimental resultó estar por encima de los valores establecidos para los distintos tipos de suelo. En el informe emitido por el CIQ, donde se analizó este parámetro, se reportó que la medición de la permeabilidad en las muestras analizadas fue aparente, esto debido a que en el proceso de secado de la muestra se formaban pequeñas grietas que causaron que los valores de permeabilidad tendieran a elevarse. En el estudio elaborado por Palacio-Haro et al. (2019), se demuestra que la cantidad de partículas de arena que tiene un suelo cumplen un papel fundamental para el mejoramiento de su permeabilidad. Por esta razón, al evaluar los tratamientos de bioestimulación en un suelo de característica estructural limo arcillosa, con un porcentaje medio o bajo de partículas de arena, es posible que el parámetro analizado no demostrara una alteración evidente.

Otro parámetro analizado fue la saturación de agua ( $S_w$ ). Esta se refiere a la fracción o porcentaje del volumen de los poros de un suelo que está ocupada por agua en relación con el volumen total de los poros (Valencia, 2019). Al considerarse como la cantidad máxima de agua que un suelo puede retener, existen valores que van desde menos del 10% de saturación para suelos arenosos hasta 150% de saturación para suelos muy arcillosos y/o con un alto contenido de materia orgánica (Flores y Alcalá, 2010).

En general, una proporción cercana al 40% de la capacidad de campo se utiliza en suelos de granulometría fina (elevado porcentaje de arcillas y limos), mientras que en suelos arenosos se utiliza una proporción cercana al 60% de la capacidad de campo del suelo (Viñas, 2005). Este parámetro se ve afectado por el tipo y el contenido de arcilla, así como por el tipo y el contenido de materia orgánica. En suelos arcillosos, existe una alta capacidad de

retención de agua de las partículas de arcilla en comparación con otros tipos de suelo. Sin embargo, se compactan fácilmente al manipularlos en condiciones húmedas y, así, se limita la disponibilidad de oxígeno y disminuye su actividad microbiana (Rucks et al., 2004; INTAGRI, 2017). Los porcentajes de  $S_w$  que presentó el suelo sometido a bioestimulación fueron desde 15,03% +/- 6,67 hasta 93,46% +/- 5,21 en fase de terrarios y de 20,33% +/- 0,56 a 44,25% +/- 10,55 en fase de biopilas, que fácilmente se comparan con valores de bajos a medios en saturación de agua como se esperaba. Entre mayor cantidad de arcilla, mayor cantidad de agua retenida. Por ello, los suelos arenosos suelen saturarse más rápidamente que un suelo arcilloso (INTAGRI, 2017).

Durante la experimentación, en fase de terrarios y biopilas, este parámetro se vio afectado directamente por la frecuencia de riego que se utilizó para mantener un ambiente húmedo adecuado para el desarrollo microbiano. Iturbe, Flores, Chávez y Roldán (2002) destacan que para una buena actividad microbiana y una biodegradación aeróbica se necesita mantener el contenido de humedad entre el 70 y 90 % de la capacidad de campo del suelo. Para lograr esto, se riegan las biopilas con 100 litros de agua una vez a la semana.

Para los ensayos en campo de este estudio, en cambio, se regó cada dos días según el nivel de humedad que se podía observar en las biopilas. Es decir, no hubo una medición constante debido al clima cambiante de la Amazonía. De la misma manera, en el caso de los terrarios, no se pudo tener un control riguroso de humedad de cada unidad experimental en condiciones de laboratorio. Por esta razón, no se consideró un análisis decisivo para determinar los mejores tratamientos en función de la mejora de la estructura de los suelos arcillosos contaminados con hidrocarburos.

El espacio libre o gas ( $S_a$ ), según Rucks et al. (2004), se refiere al volumen de poros no ocupados por agua ni por hidrocarburos. Una mayor cantidad de espacio libre permite la circulación del aire en el suelo que es esencial para garantizar una buena aireación y difusión de gases esenciales con los que se mantienen las actividades biológicas del suelo y una actividad microbiana efectiva. Para este parámetro, la FAO (2009) menciona que los porcentajes menores a 2% suponen un espacio vacío muy bajo; valores de 2 a 5 %, bajo; de 5 a 15%, medio; de 15 a 40%, alto; y valores superiores a 40%, muy altos.

En este parámetro específicamente, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas tanto en fase de terrarios como en biopilas, lo que resultó fundamental para la definición de los mejores tratamientos de bioestimulación. En fase de terrarios, se observó que el tratamiento con mayor porcentaje de *Sa* fue el de *Rhizobium* con 66,68 +/- 1,82%. Sin embargo, no fue estadísticamente diferente al del suelo no tratado; mientras que, en las biopilas, el tratamiento *Bacillus* condujo a menor espacio libre (31,90 +/- 13,62%) disponible que el suelo contaminado sin tratar (43,07 +/- 10,20). Por tanto, en campo, este tratamiento de bioestimulación suscitó cambios detectables al hacerlo pasar de muy alto a alto.

Esto se puede explicar porque existen casos en los que la disminución del espacio vacío entre las partículas del suelo no es considerada como un efecto negativo necesariamente. Al relacionar este parámetro con los porcentajes de espacio poroso, permeabilidad y producción de CO<sub>2</sub>, donde los valores del tratamiento *Bacillus* fueron en su mayoría altos, se puede inferir que la disminución del espacio libre o gas pudo haber sido el resultado de procesos naturales del suelo, la mejora de retención de nutrientes y agua y, con esto, a su vez, mantuvo una mayor compactación y permeabilidad. En este contexto, la disminución del espacio libre se interpreta como un indicio de actividad microbiana que se desarrolló en este entorno, además de que la alta permeabilidad del suelo también sugiere que la retención de recursos es más eficiente (Jaramillo, 2002).

La saturación de petróleo (*S<sub>o</sub>*), por su parte, se refiere a la fracción de poros de un suelo que está ocupada por petróleo. Se expresa, generalmente, como un valor decimal o como un porcentaje (Flores, 2019). Una reducción de la saturación de petróleo mediante la degradación microbiana de los hidrocarburos contribuye a mejorar la estructura del suelo arcilloso y promueve una recuperación más efectiva del suelo contaminado. La capacidad degradadora de las poblaciones microbianas frente a la biodisponibilidad de los contaminantes constituye el fundamento sobre el que se sustentan las técnicas y tecnologías de biorremediación (Cabanillas y Pissani, 2015).

Una limitación que tienen las técnicas biológicas de biorremediación en comparación con las técnicas fisicoquímicas es el tiempo requerido para alcanzar una biodegradación aceptable de acuerdo con las normativas vigentes y la modificación notoria de las propiedades intrínsecas del suelo (Viñas, 2005). Esta experimentación tuvo como objetivo modificar la estructura del suelo contaminado para facilitar la biorremediación. No obstante,

al limitar la investigación a tratamientos de bioestimulación que engloban las condiciones óptimas preestablecidas para la producción de EPS de géneros microbianos-cepa específicos y aplicarlos en una matriz sin previa caracterización microbiana, resulta difícil atribuir que se bioestimuló únicamente a los microorganismos con capacidad degradadora y géneros microbianos productores de EPS.

Se adiciona a esto el hecho de que Moreno, González y Blanco (2004) destaquen que algunos microorganismos pueden utilizar derivados del petróleo como fuente de carbono, convertirlos en compuestos fácilmente asimilables y favorecer su eliminación. En los tratamientos de bioestimulación aplicados como parte de las condiciones establecidas para la producción de EPS, tenían en su composición distintas fuentes de nitrógeno, carbono y sales que pudieron haber reemplazado al contaminante como la fuente principal de energía para su metabolización. En otras palabras, se considera que la bioestimulación no resultó efectiva como para alterar la saturación de petróleo en función de los géneros blanco establecidos para cada tratamiento porque los bioestimulantes aplicados fueron aprovechados, en su mayoría, por la microbiota, la microfauna y la microflora propias del suelo contaminado y, de esta manera, los cambios obtenidos en función de mejoría de la estructura del suelo contaminado no fueron los esperados.

#### **6.4. Respiración de suelo y recuentos microbianos**

Viñas (2005) recomienda seguir una serie de pasos para llevar a cabo una biorremediación efectiva de suelos contaminados. En primer lugar, se plantea tener una caracterización microbiológica del suelo contaminado y determinar la cantidad de microorganismos degradadores presentes en él. Una vez caracterizada la microbiota autóctona, hay que determinar la proporción de los biodegradadores respecto a la población microbiana total del medio y evaluar si estos se encuentran metabólicamente activos o serían activables en condiciones de bioestimulación. Después de esto, se evalúan los contaminantes, su biodisponibilidad y degradabilidad. Por último, en función de estos resultados, se analizan los factores fisicoquímicos y microbiológicos que puedan llevar a cabo la biodegradación y alterarla en función de la recuperación de las propiedades naturales del suelo y la mejoría de su calidad intrínseca.

En otras palabras, para llevar a cabo cualquier estudio de biorremediación, es crucial determinar si la población microbiana presente en el suelo es capaz de degradar los contaminantes presentes en él y si esta comunidad es suficiente para completar el proceso de biorremediación en un tiempo razonable (Wrenn y Venosa, 1996). Dicho esto, la bioestimulación cumple un papel fundamental para el desarrollo de los microorganismos con capacidad degradadora y es tanto más efectiva cuanto estos más utilicen los contaminantes del medio a su favor.

Los tratamientos de bioestimulación aplicados al suelo contaminado con hidrocarburos incluyeron diferentes fuentes de carbono como melaza y sacarosa, fuentes de nitrógeno como extracto de levadura y sales minerales como el sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ), que se destacan como elementos imprescindibles para llevar a cabo los procesos metabólicos de cualquier organismo vivo (Caycedo, Constanza y Trujillo, 2021). Se aplicaron estas fuentes de nutrientes según las mejores condiciones establecidas en investigaciones anteriores para estimular la producción de EPS por parte de distintos géneros microbianos, , entre ellos, *Pseudomonas* (González, 2019), *Azotobacter* (Molina, 2020), *Rhizobium* (Zaldumbide, 2020) y *Bacillus* (Ortega, 2022), como estrategia de mejora de la estructura de los suelos contaminados.

Como se sabe, los microorganismos pueden utilizar los contaminantes de su entorno como alimento para su desarrollo y crecimiento, transformándolos en formas menos tóxicas y, en el mejor de los casos, mineralizándolos hasta dióxido de carbono y agua (Cabanillas y Pissani, 2015). En terrarios y biopilas, se observó un incremento evidente de la población microbiana en los recuentos bacterianos y fúngicos justamente porque, al adicionar nutrientes como melaza, sacarosa o extracto de levadura como fuentes asimilables de energía, se estimularon los procesos de crecimiento, multiplicación y desarrollo metabólico de los microorganismos autóctonos del suelo. Como resultado de estos procesos, en el parámetro de respiración de suelo, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos *Azotobacter* y *Bacillus* y el control en la fase de terrarios, lo que demostró que la bioestimulación generó mayor actividad microbiana en el suelo tratado.

Ramos y Zúñiga (2008) señalan que la producción de  $CO_2$  es una estimación de la actividad microbiana y, por lo tanto, de la presencia microbiana en un ecosistema. Esta actividad varía según una diversidad de factores, incluido el uso del suelo, la mineralogía, la

cobertura vegetal, las prácticas de manejo, la calidad de los desechos que ingresan al sistema y los factores ambientales. Sin embargo, en fase de biopilas, este fenómeno resultó imperceptible. En este sentido, el mismo estudio menciona que se ha reportado que la actividad microbiana, medida por el CO<sub>2</sub> desprendido, está fuertemente influenciada por el potencial hídrico del ecosistema. Si se toman en cuenta las inconsistencias que se presentaron en cuanto al mantenimiento de una concentración de humedad adecuada para el desarrollo de los microorganismos en fase de biopilas, es posible que se hayan visto alterados los niveles de CO<sub>2</sub> por estas circunstancias.

Además, es importante considerar que, al aplicar los tratamientos de bioestimulación en cantidades mayores de tierra cuando las condiciones iniciales de los tratamientos se establecieron en ambiente de laboratorio y enfocadas a géneros bacterianos específicos, es posible que las condiciones ambientales de los ensayos en campo afectaran directamente la actividad de los microorganismos. Al tener que prescindir del control de condiciones como la temperatura y el pH del medio, que resultan esenciales a la hora de favorecer el buen crecimiento de una población microbiana (Cabanillas y Pissani, 2015), es poco probable que se pueda atribuir cualquier cambio observado exclusivamente a los tratamientos de bioestimulación empleados.

Finalmente, se puede decir que se escogieron los tratamientos *Rhizobium* y *Bacillus* para experimentar en los ensayos en campo con biopilas piloto por destacar en estudios anteriores como géneros con potencial biorremediador, fácilmente cultivables y con bajos requerimientos nutricionales (Zaldumbide, 2020; Ortega, 2022). Además, fueron determinantes los resultados observados en parámetros fisicoquímicos como el porcentaje de espacio poroso, el espacio libre o gas y la saturación de agua, donde se destacó el tratamiento *Rhizobium*, así como aquellos obtenidos en los parámetros microbiológicos del tratamiento *Bacillus*, por su participación en el aumento de la población microbiana de los suelos contaminados con hidrocarburos mediante mayor producción de CO<sub>2</sub> y recuentos bacterianos.

## 7. CONCLUSIONES

En términos generales, se puede decir que, debido a la aplicación de los tratamientos de bioestimulación, se registró un aumento en los parámetros densidad aparente (a excepción del tratamiento *Rhizobium*), permeabilidad y saturación de agua, a pesar de que se esperaba su disminución para una mejora de la estructura de los suelos arcillosos.

Los recuentos bacterianos y fúngicos y la producción de CO<sub>2</sub> como indicadores de la actividad microbiana del suelo registraron una mejoría en la calidad de la microbiota propia del suelo y su diversidad microbiológica. Por el contrario, aspectos como espacio poroso (a excepción del tratamiento *Rhizobium*) y espacio libre o gas registraron una disminución. Se esperaba que estos parámetros aumentaran para una mejor condición de aireación, retención y flujo de nutrientes o formación de agregados del suelo.

Al establecer las condiciones óptimas de producción de EPS de cada microorganismo en condiciones controladas y con los géneros microbianos implicados aislados, estos aprovechan al máximo los nutrientes o sustratos que se les otorga. Sin embargo, al aplicar estas mismas condiciones de bioestimulación en un suelo sin caracterización microbiana, los nutrientes son aprovechados por toda la microbiota presente en este medio, de tal manera que no se puede asegurar la máxima producción de EPS de los géneros blanco establecidos para formar agregados de suelos de mayor tamaño y mejorar, así, la estructura del suelo.

A nivel de terrarios, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos *Rhizobium* y *Bacillus*, respecto a los demás, siendo estos los seleccionados para llevar la experimentación a fase de campo. Estos tratamientos fueron escogidos en función de la disminución de la densidad aparente de los suelos, la transformación de los suelos a porcentajes ideales de espacio poroso y el aumento del espacio libre o gas, al igual que de la cantidad de microorganismos presentes en ellos y el incremento de su actividad metabólica.

A nivel de biopilas, únicamente se produjo cambio en la cantidad de microorganismos presentes en las matrices contaminadas y el espacio libre o gas. Se observaron diferencias entre tratamientos en los análisis de recuentos de hongos y bacterias

y, en el caso de los análisis fisicoquímicos, en el volumen de poros no ocupados por agua ni por hidrocarburos.

Los tratamientos de bioestimulación aplicados según las condiciones óptimas para la excreción de EPS de géneros microbianos previamente establecidas consiguieron modificar la estructura de los suelos contaminados con hidrocarburos en determinados aspectos fisicoquímicos, más no en cuanto a agregados de suelo o su granulometría.

Por último, se puede recalcar que hubo una disminución en los niveles de TPH del suelo al finalizar la aplicación de los tratamientos de bioestimulación en las biopilas piloto en fase de campo. Por esta razón, se puede decir que los tratamientos aplicados produjeron una disminución de la biodisponibilidad de hidrocarburos.

Los resultados de este estudio sugieren que el tipo de bioestimulante utilizado, la composición de las partículas del suelo, las condiciones ambientales y el tiempo de experimentación son las razones por las que no hubo cambios en los porcentajes de partículas de finos, arena y grava después de la bioestimulación.

Finalmente, al obtener los resultados de caracterización fisicoquímica y granulométrica de los suelos, se observó que la matriz utilizada en este proyecto de investigación corresponde a un suelo de clasificación limo arcilloso. Por esta razón, se recomienda que, al llevar esta experimentación a escalas mayores, se considere hacer un mapeo del tipo de suelo y su composición, al igual que un muestreo riguroso de los puntos aleatorios de la matriz heterogénea que puedan asegurar que la muestra sea representativa de la fuente de contaminación que se pretende biorremediar.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuerdo Ministerial 097, Registro Oficial 387 Año III AM 097 § 4.7 Remediación de suelos (2015). [https://www.gob.ec/sites/default/files/regulations/2018-09/Documento\\_Registro-Oficial-No-387-04-noviembre-2015\\_0.pdf](https://www.gob.ec/sites/default/files/regulations/2018-09/Documento_Registro-Oficial-No-387-04-noviembre-2015_0.pdf)
- Alef, K. (1995). 4—Enrichment, isolation and counting of soil microorganisms. En K. Alef & P. Nannipieri (Eds.), *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry* (pp. 123-191). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012513840-6/50019-7>
- Alier, J. M. (2008). Conflictos ecológicos y justicia ambiental. *Papeles*, 103, 53.
- American Society for Testing and Materials. (2017). ASTM D422-63 Standard Test Method for Particle-Size Analysis of Soils (1.<sup>a</sup> ed.). American Society for Testing and Materials. <https://www.astm.org/standards/d422>
- ASTM. (2020). Standard Practice for Classification of Soils for Engineering Purposes (Unified Soil Classification System). ASTM. <https://www.astm.org/d2487-17e01.html>
- Appling, D. R., Anthony-Cahill, S. J. y Mathews, C. K. (2019). *Biochemistry: Concepts and connections* (Second edition). Pearson.
- Avella, J. y Javier, D. (2007). Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp. Mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16s [Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Javeriana]. <http://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8544>
- Avendaño, E. M., Pérez, R. M. y Rodríguez, G. S. (2014). Aislamiento, cultivo, viabilidad y evaluación de un consorcio cianobacteria-microalga como acondicionador de suelos. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 35(1-2), 51-71. <https://doi.org/10.26807/remcb.v35i1-2.249>
- Baridón, E. (2019). Guías de Edafología. Tema 5: Porosidad y aireación. [https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/42969/mod\\_resource/content/1/POROSIDAD%20Y%20AIREACION%2026-3-19.pdf](https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/42969/mod_resource/content/1/POROSIDAD%20Y%20AIREACION%2026-3-19.pdf)

- Beltran, R. M. S. (2013). Guía de métodos de biorremediación para la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos [Tesis de Maestría, Universidad Libre]. <https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/10607/TRABAJO%20FINAL%20cd.pdf?sequence=1>
- Beristain, C., Rovira, D. y Fernández, I. (Eds.). (2008). El espacio crítico feminista: Alianzas entre ONGD y organizaciones de mujeres latinoamericanas (1.ª ed.). Hegoa.
- Bermúdez, J. (2012). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a partir del uso de un consorcio bacteriano alóctono en la zona costera de Punta Majagua. Cienfuegos, Cuba [Tesis, Universidad Central «Marta Abreu» de Las Villas]. <http://dspace.uclv.edu.cu:8089/xmlui/handle/123456789/3176>
- Bottomley, P., Angle, J. y Weaver, R. (Eds.). (2020). *Métodos de análisis de suelos, Parte 2: Propiedades microbiológicas y bioquímicas* (Vol. 12). John Wiley & Sons.
- Brutti, L. N., Beltran, M. J. y García de Salamone, I. (2018). Biorremediación de los recursos naturales (1.ª ed.). Ediciones INTA. <http://repositorio.inta.gob.ar:80/handle/20.500.12123/4027>
- Buendía, H. (2012). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante compost de aserrín y estiércoles [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/2290>
- Cabanillas, J. W. y Pissani, V. H. (2015). Efecto de la bioaumentación y bioestimulación en la eficiencia de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo]. <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/456>
- Calvache, A. (2015). Los suelos del Ecuador. [https://www.researchgate.net/publication/301701400\\_los\\_suelos\\_del\\_ecuador](https://www.researchgate.net/publication/301701400_los_suelos_del_ecuador)
- Campaña, S. (2016). Tipos de Suelos en El Ecuador | Suelo | Roca (geología). <https://pt.scribd.com/document/311163645/Tipos-de-Suelos-en-El-Ecuador>
- Cando, M. (2011). Determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos [Tesis de Licenciatura, Universidad Politécnica Salesiana]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/1520>

- Caycedo, L., Constanza, L. y Trujillo, D. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19(36), 49-94. Epub January 17, 2021. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Chenu, C. (1993). Clay— or sand—polysaccharide associations as models for the interface between micro-organisms and soil: Water related properties and microstructure. En L. Brussaard & M. J. Kooistra (Eds.), *Soil Structure/Soil Biota Interrelationships* (pp. 143-156). Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444814906500169>
- Ciancaglini, N. (2010). Guía para la determinación de textura de suelos por método organoléptico. INTA. [http://www.prosap.gov.ar/Docs/INSTRUCTIVO%20\\_R001\\_Gu%C3%ADa%20para%20la%20determinaci%C3%B3n%20de%20textura%20de%20suelos%20por%20m%C3%A9todo%20organol%C3%A9ptico.pdf](http://www.prosap.gov.ar/Docs/INSTRUCTIVO%20_R001_Gu%C3%ADa%20para%20la%20determinaci%C3%B3n%20de%20textura%20de%20suelos%20por%20m%C3%A9todo%20organol%C3%A9ptico.pdf)
- DuBois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. y Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances | Analytical Chemistry. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Eficãcitas Consultora Cía. Ltda. (2021). *Estudio de Impacto Ambiental Ex Post Gestión de Desechos del Proyecto Amazonía Viva*. Recuperado de <https://www.eppetroecuador.ec/wp-content/uploads/downloads/2022/04/estudio-de-impacto-ambiental-ex-post-gestion-de-desechos-del-proyecto-amazonia-viva.pdf>
- EP PETROECUADOR. (2023). Reporte Gerencial 2023 (p. 62). Obtenido de <https://www.petroecuador.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2020/06/Reporte-Gerencial-2023.pdf>
- EP PETROECUADOR. (2021). Estudio de Impacto Ambiental Ex Post - Gestión de Desechos del Proyecto Amazonía Viva (p. 2). Obtenido de <https://www.eppetroecuador.ec/wp-content/uploads/downloads/2022/04/Resumen-Ejecutivo.pdf>

- Escalante, M. (2002). Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/2578>
- Evstatieva, Y., Georgieva, T. y Nikolova, D. (2017). Technological characterization of strain *Azotobacter vinelandii* using API 20NE test. [http://www.quantumsolutions.bg/API\\_ZYM\\_20NE\\_03%202017.pdf](http://www.quantumsolutions.bg/API_ZYM_20NE_03%202017.pdf)
- Fahnestock, F. M. von y Wickramanayake, G. B. (1998). Biopile design, operation, and maintenance handbook for treating hydrocarbon-contaminated soils (1.<sup>a</sup> ed.). Battelle Press. <https://www.osti.gov/biblio/679963-biopile-design-operation-maintenance-handbook-treating-hydrocarbon-contaminated-soils>
- FAO. (2009). Guía para la descripción de suelos. <https://www.fao.org/3/a0541s/a0541s.pdf>
- FAO. (2023). Propiedades Físicas del Suelo. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <https://www.fao.org/soils-portal/soil-survey/propiedades-del-suelo/propiedades-fisicas/es/>
- Fernández, L., Rojas, N., Roldán, T., Ramírez, M., Zegarra, H., Hernández, R., Reyes, R., Hernández, D. y Arce, J. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo. <https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/Libros2011/CG008215.pdf>
- Findura, P., Šindelková, I., Rusinek, R., Karami, H., Gancarz, M., & Bartoš, P. (2022). Determination of the influence of biostimulants on soil properties and field crop yields. *International Agrophysics*, 36(4), 351-359. <https://doi.org/10.31545/intagr/155955>
- Flores, J. (2019). Determinación de unidades de flujo a partir del indicador de zona de flujo (FZI) considerando el modelo petrofísico de un yacimiento sub-saturado de la cuenca del lago de Maracaibo-Venezuela. [Tesis de Licenciatura, Universidad Estatal Península de Santa Elena]. <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/4774/1/UPSE-TIP-2019-0001.pdf>

- Flores, L., y Alcalá, J. (2010). *Manual de Procedimientos Analíticos*. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://www.geologia.unam.mx/igl/deptos/lfs/manualLFS.pdf>
- Food and Agriculture Organization. (1999). El suelo, diferencias según su aspecto físico y químico. <http://www.fao.org/3/ah645s/AH645S04.htm>
- Galindo, N. J. y Rueda, C. A. (2015). Caracterización mecánica de suelos arcillosos afectados por derrames superficiales de hidrocarburos en concentración por porcentaje en peso: 5,10, 15 y 30 [Tesis de Licenciatura, Universidad Pontificia Bolivariana]. <https://repository.upb.edu.co/handle/20.500.11912/2190>
- Gómez, C. (2003). Biodisponibilidad. Concepto y cuantificación. Aplicación a emplazamientos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos. 39. <https://digital.csic.es/handle/10261/97229>
- Gómez, W., Gaviria, J. y Cardona, S. (2009). Evaluación de la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioalimentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina—Diesel. *DYNA: revista de la Facultad de Minas. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín*, 76(160), 83-93.
- González-Barrios, J., González-Cervantes, G., Sánchez-Cohen, I., López-Santos, A. y Valenzuela-Núñez, L. (2011). Caracterización de la porosidad edáfica como indicador de la calidad física del suelo. *Terra Latinoamericana*, 29(4), 369-377. Recuperado en 16 de agosto de 2023, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-57792011000400369&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792011000400369&lng=es&tlng=es).
- González, J. (2019). Producción in vitro de exopolisacáridos por *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de suelo arcilloso contaminado con hidrocarburos en la Amazonía ecuatoriana [Tesis de Licenciatura]. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- González-García, H., Gonzalez-Pedraza, A., Atencio, J. y Soto, A. (2021). Evaluación de calidad de suelos plataneros a través de la actividad microbiana en el sur del lago de Maracaibo, estado de Zulia, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 38. 216-240.

- Gordillo, A. (2018). Diversity of saprophytic fungi in the rhizoplane of plant communities naturally recolonizing oil ponds in the Amazonian areas [Tesis de Doctorado, Universidad Católica de Lovaina]. <https://dial.uclouvain.be/pr/boreal/object/boreal:195708>
- Hernández, J., Cubillos, J. y Milian, P. (2012). Aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp., asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. *Isolation of Rhizobium spp., associated two forage leguminous in the Caribbean Biotechnological Center. Revista Colombiana de Microbiología*, 2(2), 51-62.
- Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria. (2015). Análisis microbiológico de suelos (2.<sup>a</sup> ed.). Departamento de Transferencia e Información Tecnológica. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/Av-1820.PDF>
- INTAGRI. (2017). Propiedades Físicas del Suelo y el Crecimiento de las Plantas. Serie Suelos. Núm. 29. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 5 p. <https://www.intagri.com/articulos/suelos/propiedades-fisicas-del-suelo-y-el-crecimiento-de-las-plantas>
- Iturbe-Argüelles, R., Flores-Torres, C., Chávez-López, C. y Roldán-Martín, A. (2002). Saneamiento de suelos contaminados con amiento de suelos contaminados. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 3(1), 25-35. <https://doi.org/10.22201/fi.25940732e.2002.03n1.004>
- Jaramillo, D. (2002). *Introducción a la ciencia del suelo*. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/70085/70060838.2002.pdf>
- Llanes, O. (2012). *Análisis espectrales de indicadores de acuíferos asociados a ecosistemas de zonas áridas en el Noroeste de México*. [Tesis de Doctorado, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.]. [https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/219/1/llanes\\_o.pdf](https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/219/1/llanes_o.pdf)
- Logan, N. (2009). Genus I. *Bacillus*. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2.<sup>a</sup> ed., Vol. 3, pp. 21-25). Springer.
- López, R. (2002). Degradación del suelo: Causas, procesos, evaluación e investigación. SC-75, 280.

- López-Alcocer, J., Lépiz-Ildelfonso, R., González-Eguiarte, D., Macías, R., López-Alcocer, E. y Olalde-Portugal, V. (2017). Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de *Rhizobium* colectadas en frijol común silvestre y domesticado. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(1), 73-81. <https://doi.org/10.35196/rfm.2017.1.73-81>
- Maldonado, C. (2003). Evaluación de la atenuación natural de hidrocarburos del petróleo utilizados como supresores de polvo en carreteras sin pavimentar [Tesis de Licenciatura, Universidad de los Andes]. <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/21638/u251304.pdf?sequence=1>
- Molina, G. N. (2020). Determinación de las condiciones para producción de mucopolisacáridos por aislados de *Azotobacter* provenientes de suelos arcillosos contaminados con hidrocarburos de la región amazónica. [Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <http://repositorio.puce.edu.ec:80/xmlui/handle/22000/18037>
- Moreira, M. y Siqueira, J. (2002). Microbiología e bioquímica do solo. [Tesis de Maestría, Escola Superior Politécnica del Litoral]. UFLA. Brasil. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/8666/1/lkrebs.pdf>
- Moreno, C., González, A., y Blanco, M. (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Rev Iberoam Micol*, 21(1), 103-120.
- Naranjo, D. (2017). Aislamiento e identificación de microorganismos con capacidad de degradar hidrocarburos en suelos contaminados de la comunidad Lumbaqui, provincia de Sucumbíos | Semantic Scholar [Tesis de Licenciatura, Universidad de las Américas]. <https://www.semanticscholar.org/paper/Aislamiento-e-identificaci%C3%B3n-de-microorganismos-con-Gonz%C3%A1lez-Carolina/af99096c4bd13fe69df1d689a8ae3298710f885e>
- Núñez, J. (2001). Fundamentos de Edafología. EUNED.
- Olson, K. (1985). Characterization of pore size distributions within soils by mercury intrusion and water - release methods. *Soil Sci.*, 139 (5):400 - 404.

- Ortega, J. (2022). Arcillosos de la Amazonía Ecuatoriana contaminados con hidrocarburos. [Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <http://repositorio.puce.edu.ec:80/handle/22000/20918>
- Pinot, R. H. (2000). Manual de Edafología. Ed.Computec. Chile.
- Pontes, N. (2020). Ecuador: Indígenas temen hambruna por derrames de petróleo en la Amazonía durante la pandemia. DW.COM. <https://www.dw.com/es/ecuador-indigenas-temen-hambruna-por-derrames-de-petroleo-en-la-amazonia-durante-la-pandemia/a-53297986>
- Ramírez, A. R., Sánchez, E. R., Chimal, C. Y. y Chan, M. D. (2011). Selección de *Bacillus* spp. Con actividad antagonica in vitro contra *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. En diferentes medios de cultivo. *Fitosanidad*, 15(2), 117-121.
- Rivas, J. y Loyola, C. (2022). Desarrollo de la región de Ñuble: prospectiva según la permeabilidad de los suelos. *Tiempo Y Espacio*, (49), 64–79. <https://doi.org/10.22320/rte.vi49.5827>
- Rodríguez, M. de las N. (1993). Asociación *Rhizobium*-leguminosa. En R. Ferrera, M. del C. Á. González y M. de las N. Rodríguez (Eds.), *Manual de agromicrobiología* (1.<sup>a</sup> ed., Vol. 1, p. 142). Trillas. <https://www.worldcat.org/title/manual-de-agromicrobiologia/oclc/316060117>
- Rucks, L., García, F., Kaplán, A., Ponce de León, J., y Hill, M. (2004). Propiedades físicas del suelo. Universidad de la República. <https://bibliofagro.pbworks.com/f/propiedades+fisicas+del+suelo.pdf>
- Ruiz, A. (2019). La Biorremediación Como Técnica Para La Descontaminación De Suelos Contaminados Por Hidrocarburos En Los Municipios Del Bloque Cpo9 [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Abierta y a Distancia Acacias-Meta]. <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/27737/asruizo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sánchez, J. (2002). Introducción al diseño experimental (1.<sup>a</sup> ed.). Cámara Ecuatoriana del Libro. <https://isbn.cloud/9789978425206/introduccion-al-diseno-experimental/>

- Sánchez, J. (2016). Introducción a la estadística en las ciencias biológicas. Giro Creativo. <http://biblioteca.espam.edu.ec/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=1056>
- Sarmiento, W. (2017). Determinación indirecta de la permeabilidad del suelo mediante el ensayo edométrico [Tesis de Licenciatura, Universidad del Azuay]. <https://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/7333/1/13263.pdf>
- Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S., y Denef, K. (2004). A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil and Tillage Research*, 79(1), 7-31. <https://doi.org/10.1016/j.still.2004.03.008>
- Somasegaran, P. y Hoben, H. (1994). Handbook for Rhizobia (1.<sup>a</sup> ed.). Springer. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4613-8375-8>
- Suarez Beltran, R. M. (2013). Guía de métodos de biorremediación para la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos (tesis de postgrado). Universidad Libre, Bogotá D.C.
- Sylvia, D., Fuhrmann, J., Hartel, P y Zuberer, D. (2005). *Principles and Applications of Soil Microbiology* (No. QR111 S674 2005). Pearson.
- Tejera-Hernández, B., Heydrich-Pérez, M. y Rojas-Badía, M. (2013). Aislamiento de Bacillus solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. *Agronomía Mesoamericana*, 24(2), 357-364.
- Torres-Guerrero, C., Etchevers B., Fuentes-Ponce, M, Govaerts, B., León-González, F. y Herrera, J. (2013). Influencia de las raíces sobre la agregación del suelo. *Terra Latinoamericana*, 31(1), 71-84. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-57792013000100071&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792013000100071&lng=es&tlng=es).
- Umer, M. y Rajab, S. (2012). Correlation between aggregate stability and microbiological activity in two Russian soil types. *Eurasian journal of soil science*, 1(1), 45-50.
- Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). (2019). *Clasificación del suelo*. <https://www.google.com/url?client=internal-element-cse&cx=007197090300231128638:etbigalvwwm&q=https://www2.ulpgc.es/hege/al>

macen/download/31/31448/suelos.pdf&sa=U&ved=2ahUKEwjQnJeU4MaAAxWG  
i7AFHYYbD0kQFnoECACQAg&usg=AOvVaw1tbeMrk1dIRpi-8gowbH\_i

- Valencia, L. (2019). Evaluación petrofísica para una formación geológica, caso de estudio yacimiento petrolero en bancos colíticos.pdf [Tesis de Licenciatura, Instituto Politécnico Nacional].  
<https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/27048/Evaluaci%3%b3n%20petrof%3%adsica%20para%20una%20formaci%3%b3n%20geol%3%b3gca%2c%20caso%20de%20estudio%20yacimiento%20petrolero%20en%20bancos%20col%3%adicos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Viñas, M. (2005). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: Caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica*. [Universitat de Barcelona].  
[https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2396/TESIS\\_MVINAS\\_CANALS.pdf](https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2396/TESIS_MVINAS_CANALS.pdf)
- Vogel, C. y Smith, J. (2002). Building social resilience in arid ecosystems. En *Global Desertification: Do Humans Cause Deserts?* (eds. Reynolds, J.F. y Stafford Smith, M.). Dahlem University Press, Berlin, Alemania 149-166.
- Wrenn, B. y Venosa, A. (1996). Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbondegrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Can. J. Microbiol.* 42 :252-258.
- Zaldumbide, K. (2020). Optimización de condiciones abióticas para la mayor producción de exopolisacáridos de bacterias del grupo Rizobio aisladas de suelo contaminado con hidrocarburos [Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador].  
<http://repositorio.puce.edu.ec:80/xmlui/handle/22000/18533>

## ANEXOS

**Anexo 1.** Tratamientos establecidos, de acuerdo con las condiciones óptimas para la producción de exopolisacáridos en *Pseudomonas* (González, 2019), *Azotobacter* (Molina, 2020), *Rhizobium* (Zaldumbide, 2020) y *Bacillus* (Ortega, 2022).

<b>Tratamientos</b>	<b>Blanco microbiano</b>	<b>Composición</b>
T1	<i>Pseudomonas</i>	20 g/l de melaza
T2	<i>Azotobacter</i>	20 g/l de melaza + 0,14 g/l de MgSO <sub>4</sub>
T3	<i>Rhizobium</i>	10 g/l de sacarosa + 1 g/l de extracto de levadura
T4	<i>Bacillus</i>	30 g/l melaza + 3 g/l de extracto de levadura
T5	Combinado	30 g/l melaza + 10 g/l de sacarosa + 0,14 g/l de MgSO <sub>4</sub> + 2 g/l de extracto de levadura
Control	-	Suelo contaminado

## Anexo 2. Comparaciones paramétricas y no paramétricas con resultados post hoc entre tratamientos de bioestimulación de la fase de terrarios en SPSS.

### Recuento de hongos

#### Resumen de prueba de hipótesis

Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1 La distribución de RecHongos es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,173	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

### Densidad real

#### Resumen de prueba de hipótesis

Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1 La distribución de DReal es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,078	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

### Recuento de bacterias

#### Resumen de prueba de hipótesis

Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1 La distribución de RecBacterias es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,016	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

### Densidad aparente

#### Resumen de prueba de hipótesis

Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1 La distribución de DAparente es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,011	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

### Recuento de bacterias – Pos hoc de Kruskal-Wallis

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error Error	Dev. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.
Rhizobium-Control	2,333	4,359	,535	,592	1,000
Rhizobium-Pseudomonas	7,000	4,359	1,606	,108	1,000
Rhizobium-Bacillus	-9,000	4,359	-2,065	,039	,584
Rhizobium-Combinado	-12,000	4,359	-2,753	,006	,089
Rhizobium-Azotobacter	12,667	4,359	2,906	,004	,055
Control-Pseudomonas	-4,667	4,359	-1,071	,284	1,000
Control-Bacillus	-6,667	4,359	-1,529	,126	1,000
Control-Combinado	-9,667	4,359	-2,218	,027	,399
Control-Azotobacter	-10,333	4,359	-2,371	,018	,266
Pseudomonas-Bacillus	-2,000	4,359	-,459	,646	1,000
Pseudomonas-Combinado	-5,000	4,359	-1,147	,251	1,000
Pseudomonas-Azotobacter	-5,667	4,359	-1,300	,194	1,000
Bacillus-Combinado	-3,000	4,359	-,688	,491	1,000
Bacillus-Azotobacter	3,667	4,359	,841	,400	1,000
Combinado-Azotobacter	,667	4,359	,153	,878	1,000

Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas.  
Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es ,05.  
Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni para varias pruebas.

### Densidad aparente – Pos hoc de Kruskal-Wallis

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error Error	Dev. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.
Rhizobium-Bacillus	-3,333	4,357	-,765	,444	1,000
Rhizobium-Combinado	-7,333	4,357	-1,683	,092	1,000
Rhizobium-Control	9,000	4,357	2,066	,039	,583
Rhizobium-Azotobacter	10,333	4,357	2,372	,018	,265
Rhizobium-Pseudomonas	15,000	4,357	3,443	,001	,009
Bacillus-Combinado	-4,000	4,357	-,918	,359	1,000
Bacillus-Control	5,667	4,357	1,301	,193	1,000
Bacillus-Azotobacter	7,000	4,357	1,607	,108	1,000
Bacillus-Pseudomonas	11,667	4,357	2,678	,007	,111
Combinado-Control	1,667	4,357	,383	,702	1,000
Combinado-Azotobacter	3,000	4,357	,689	,491	1,000
Combinado-Pseudomonas	7,667	4,357	1,760	,078	1,000
Control-Azotobacter	-1,333	4,357	-,306	,760	1,000
Control-Pseudomonas	-6,000	4,357	-1,377	,168	1,000
Azotobacter-Pseudomonas	4,667	4,357	1,071	,284	1,000

Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas.  
Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es ,05.  
Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni para varias pruebas.

### Saturación de petróleo

#### Resumen de prueba de hipótesis

Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1 La distribución de SatPetróleo es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,066	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

### % Arena

#### Resumen de prueba de hipótesis

Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1 La distribución de Arena es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,123	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

**% Finos****Resumen de prueba de hipótesis**

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Finos es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,123	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

**Permeabilidad****ANOVA de un factor**

Permeabilidad					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	7372458158	5	1474491632	2,619	,080
Intra-grupos	6755202657	12	562933554,7		
Total	14127660814	17			

**Espacio poroso****Resumen de prueba de hipótesis**

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de EspacioPoroso es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,010	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

**CO<sub>2</sub>****ANOVA**

CO <sub>2</sub>					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	58,007	4	14,502	3,434	,031
Dentro de grupos	71,793	17	4,223		
Total	129,800	21			

**Espacio poroso – Pos hoc de Kruskal-Wallis**

Muestra1-Muestra2	Prueba estadística	Error típico	Dev. Prueba estadística	Sig.	Sig. ady.
Pseudomonas-Azotobacter	-.333	4,359	-.076	,839	1,000
Pseudomonas-Combinado	-6,000	4,359	-1,376	,169	1,000
Pseudomonas-Control	6,333	4,359	1,453	,146	1,000
Pseudomonas-Bacillus	-12,000	4,359	-2,753	,006	,089
Pseudomonas-Rhizobium	-12,333	4,359	-2,829	,005	,070
Azotobacter-Combinado	-5,667	4,359	-1,300	,194	1,000
Azotobacter-Control	6,000	4,359	1,376	,169	1,000
Azotobacter-Bacillus	-11,667	4,359	-2,677	,007	,112
Azotobacter-Rhizobium	-12,000	4,359	-2,753	,006	,089
Combinado-Control	,333	4,359	,076	,939	1,000
Combinado-Bacillus	6,000	4,359	1,376	,169	1,000
Combinado-Rhizobium	6,333	4,359	1,453	,146	1,000
Control-Bacillus	-5,667	4,359	-1,300	,194	1,000
Control-Rhizobium	-6,000	4,359	-1,376	,169	1,000
Bacillus-Rhizobium	,333	4,359	,076	,939	1,000

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas. Se muestran las significancias asintóticas (pruebas de 2 caras). El nivel de significancia es ,05.

**CO<sub>2</sub> - Post hoc Tukey****CO<sub>2</sub>**HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Control	2	2,750	
Rhizobium	2	4,950	4,950
Pseudomonas	6	6,417	6,417
Azotobacter	6		7,700
Bacillus	6		8,250
Sig.		,192	,276

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

- Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,333.
- Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

**Saturación de agua****ANOVA de un factor**

SatAgua					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	7169,830	5	1433,966	19,168	,000
Intra-grupos	897,736	12	74,811		
Total	8067,566	17			

**Saturación de agua - Post hoc Tukey****Espacio libre o gas****ANOVA de un factor**

EspacioLibreGas					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	6894,015	5	1378,803	17,195	,000
Intra-grupos	962,223	12	80,185		
Total	7856,238	17			

**Espacio libre o gas - Post hoc Tukey**

SatAgua					EspacioLibreGas					
HSD de Tukey <sup>a</sup>					HSD de Tukey <sup>a</sup>					
Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3			1	2	3	4
Rhizobium	3	29,7133			Pseudomonas	3	5,4367			
Control	3		56,9267		Azotobacter	3	17,1167	17,1167		
Combinado	3		58,2733		Bacillus	3		31,9000	31,9000	
Bacillus	3		67,7400		Combinado	3		40,5333	40,5333	
Azotobacter	3		79,8267	79,8267	Control	3			43,0733	43,0733
Pseudomonas	3			93,4567	Rhizobium	3				66,6767
Sig.		1,000	,061		Sig.		,615	,065	,655	,062

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

### Anexo 3. Comparaciones paramétricas y no paramétricas con resultados post hoc entre tratamientos de bioestimulación de la fase de biopilas en SPSS.

Recuento de hongos					Espacio libre																																																				
<b>Resumen de prueba de hipótesis</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Hipótesis nula</th> <th>Prueba</th> <th>Sig.</th> <th>Decisión</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 La distribución de RecHongos es la misma entre las categorías de Tratamientos.</td> <td>Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes</td> <td>,027</td> <td>Rechazar la hipótesis nula.</td> </tr> </tbody> </table> <p>Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.</p>					Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión	1 La distribución de RecHongos es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,027	Rechazar la hipótesis nula.	<b>Resumen de prueba de hipótesis</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Hipótesis nula</th> <th>Prueba</th> <th>Sig.</th> <th>Decisión</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 La distribución de EspacioLibre es la misma entre las categorías de Tratamientos.</td> <td>Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes</td> <td>,039</td> <td>Rechazar la hipótesis nula.</td> </tr> </tbody> </table> <p>Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.</p>					Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión	1 La distribución de EspacioLibre es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,039	Rechazar la hipótesis nula.																																
Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión																																																						
1 La distribución de RecHongos es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,027	Rechazar la hipótesis nula.																																																						
Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión																																																						
1 La distribución de EspacioLibre es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,039	Rechazar la hipótesis nula.																																																						
<b>Recuento de hongos – Pos hoc de Kruskal-Wallis</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Muestra 1-Muestra 2</th> <th>Estadístico de contraste</th> <th>Error Error</th> <th>Dev. Estadístico de contraste</th> <th>Sig.</th> <th>Sig. ajust.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Control-Bacillus</td> <td>-3,000</td> <td>2,236</td> <td>-1,342</td> <td>,180</td> <td>,539</td> </tr> <tr> <td>Control-Rhizobium</td> <td>-6,000</td> <td>2,236</td> <td>-2,683</td> <td>,007</td> <td>,022</td> </tr> <tr> <td>Bacillus-Rhizobium</td> <td>3,000</td> <td>2,236</td> <td>1,342</td> <td>,180</td> <td>,539</td> </tr> </tbody> </table> <p>Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas. Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es ,05. Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni para varias pruebas.</p>					Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error Error	Dev. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.	Control-Bacillus	-3,000	2,236	-1,342	,180	,539	Control-Rhizobium	-6,000	2,236	-2,683	,007	,022	Bacillus-Rhizobium	3,000	2,236	1,342	,180	,539	<b>Espacio libre – Pos hoc de Kruskal-Wallis</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Muestra 1-Muestra 2</th> <th>Estadístico de contraste</th> <th>Error Error</th> <th>Dev. Estadístico de contraste</th> <th>Sig.</th> <th>Sig. ajust.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Bacillus-Rhizobium</td> <td>2,333</td> <td>2,236</td> <td>1,043</td> <td>,297</td> <td>,890</td> </tr> <tr> <td>Bacillus-Control</td> <td>5,667</td> <td>2,236</td> <td>2,534</td> <td>,011</td> <td>,034</td> </tr> <tr> <td>Rhizobium-Control</td> <td>3,333</td> <td>2,236</td> <td>1,491</td> <td>,136</td> <td>,408</td> </tr> </tbody> </table> <p>Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas. Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es ,05. Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni para varias pruebas.</p>					Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error Error	Dev. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.	Bacillus-Rhizobium	2,333	2,236	1,043	,297	,890	Bacillus-Control	5,667	2,236	2,534	,011	,034	Rhizobium-Control	3,333	2,236	1,491	,136	,408
Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error Error	Dev. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.																																																				
Control-Bacillus	-3,000	2,236	-1,342	,180	,539																																																				
Control-Rhizobium	-6,000	2,236	-2,683	,007	,022																																																				
Bacillus-Rhizobium	3,000	2,236	1,342	,180	,539																																																				
Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error Error	Dev. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.																																																				
Bacillus-Rhizobium	2,333	2,236	1,043	,297	,890																																																				
Bacillus-Control	5,667	2,236	2,534	,011	,034																																																				
Rhizobium-Control	3,333	2,236	1,491	,136	,408																																																				
<b>Saturación de petróleo</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Hipótesis nula</th> <th>Prueba</th> <th>Sig.</th> <th>Decisión</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 La distribución de SatPetróleo es la misma entre las categorías de Tratamientos.</td> <td>Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes</td> <td>,066</td> <td>Retener la hipótesis nula.</td> </tr> </tbody> </table> <p>Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.</p>					Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión	1 La distribución de SatPetróleo es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,066	Retener la hipótesis nula.	<b>Saturación de agua</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Hipótesis nula</th> <th>Prueba</th> <th>Sig.</th> <th>Decisión</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 La distribución de SatAgua es la misma entre las categorías de Tratamientos.</td> <td>Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes</td> <td>,051</td> <td>Retener la hipótesis nula.</td> </tr> </tbody> </table> <p>Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.</p>					Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión	1 La distribución de SatAgua es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,051	Retener la hipótesis nula.																																
Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión																																																						
1 La distribución de SatPetróleo es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,066	Retener la hipótesis nula.																																																						
Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión																																																						
1 La distribución de SatAgua es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,051	Retener la hipótesis nula.																																																						
<b>% Finos</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Hipótesis nula</th> <th>Prueba</th> <th>Sig.</th> <th>Decisión</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 La distribución de Finos es la misma entre las categorías de Tratamientos.</td> <td>Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes</td> <td>,719</td> <td>Retener la hipótesis nula.</td> </tr> </tbody> </table> <p>Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.</p>					Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión	1 La distribución de Finos es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,719	Retener la hipótesis nula.	<b>% Arena</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Hipótesis nula</th> <th>Prueba</th> <th>Sig.</th> <th>Decisión</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 La distribución de Arena es la misma entre las categorías de Tratamientos.</td> <td>Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes</td> <td>,854</td> <td>Retener la hipótesis nula.</td> </tr> </tbody> </table> <p>Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.</p>					Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión	1 La distribución de Arena es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,854	Retener la hipótesis nula.																																
Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión																																																						
1 La distribución de Finos es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,719	Retener la hipótesis nula.																																																						
Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión																																																						
1 La distribución de Arena es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,854	Retener la hipótesis nula.																																																						

**% Grava****Resumen de prueba de hipótesis**

Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1 La distribución de Grava es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,281	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

**CO2****Resumen de prueba de hipótesis**

Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1 La distribución de CO2 es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,075	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

**Densidad Real****ANOVA**

DReal					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,014	2	,007	3,408	,103
Dentro de grupos	,013	6	,002		
Total	,027	8			

**Densidad Aparente****ANOVA**

DAparente					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,003	2	,002	,225	,805
Dentro de grupos	,046	6	,008		
Total	,050	8			

**Permeabilidad****ANOVA**

Permeabilidad					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1707689288	2	853844644,1	3,453	,100
Dentro de grupos	1483483943	6	247247323,8		
Total	3191173231	8			

**% Espacio poroso****ANOVA**

EspacioPoroso					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	19,786	2	9,893	,777	,501
Dentro de grupos	76,367	6	12,728		
Total	96,153	8			

**Recuento de bacterias****ANOVA**

RecBacterias					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,657E+17	2	8,285E+16	34,606	,001
Dentro de grupos	1,437E+16	6	2,394E+15		
Total	1,801E+17	8			

**TPH****ANOVA**

TPH					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3057,584	2	1528,792	,398	,688
Dentro de grupos	23072,225	6	3845,371		
Total	26129,809	8			

**Recuento de bacterias - Post hoc Tukey****RecBacterias**

HSD Tukey<sup>a</sup>

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Control	3	23266666,67	
Bacillus	3	78333333,33	
Rhizobium	3		334666666,7
Sig.		,408	1,000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.