



**REPÚBLICA DEL ECUADOR**  
**UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO**  
**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**FACULTAD DE POSGRADO**

**INFORME DE INVESTIGACIÓN**

**PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:**

**MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA:**

*Pseudomonas koreensis*: evaluación de su eficiencia para biorremediación de suelos  
contaminados con diésel

**AUTOR:**

**DANIELA ELIZABETH RUIZ RUIZ**

**TUTOR:**

**M.Sc. CÉSAR STALIN GAVIN MOYANO**

*Milagro, 2024*

## Derechos de Autor

Sr. Dr.

**Fabricio Guevara Viejó**

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, **Daniela Elizabeth Ruiz Ruiz**, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de **Magíster en Biotecnología**, como aporte a la Línea de Investigación **Generación de Estrategias para la biorremediación** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Proyecto de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, **5 de noviembre del 2024**



**Daniela Elizabeth Ruiz Ruiz**

**C.I.: 1105097669**

## Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación

Yo, **César Stalin Gavin Moyano**, en mi calidad de tutor del trabajo de titulación, elaborado por **Daniela Elizabeth Ruiz Ruiz**, cuyo tema es ***Pseudomonas koreensis*: evaluación de su eficiencia para biorremediación de suelos contaminados con diésel**, que aporta a la Línea de Investigación **Generación de Estrategias para la biorremediación**, previo a la obtención del Grado **Magíster en Biotecnología**. Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 5 de noviembre del 2024



---

**Ing. César Stalin Gavin Moyano M.Sc.**

**C.I.: 0603575382**

**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**FACULTAD DE POSGRADO**  
**CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA**

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **LIC. RUIZ RUIZ DANIELA ELIZABETH**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "PSEUDOMONA KOREENSIS: EVALUACIÓN DE SU EFICIENCIA PARA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON DIÉSEL.", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	56.87
SUSTENTACIÓN	38.20
<b>PROMEDIO</b>	<b>95.07</b>
<b>EQUIVALENTE</b>	<b>Muy Bueno</b>



Firmado electrónicamente por:  
**JOSE HUMBERTO VERA  
RODRIGUEZ**

---

Msc. VERA RODRIGUEZ JOSE HUMBERTO  
**PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL**



Firmado electrónicamente por:  
**MARIA FERNANDA  
GARCÉS MONCAYO**

---

Msc GARCÉS MONCAYO MARÍA FERNANDA  
**VOCAL**



Firmado electrónicamente por:  
**YESSENIA BEATRIZ  
SARANGO ORTEGA**

---

Msc SARANGO ORTEGA YESSENIA BEATRIZ  
**SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL**

## **Dedicatoria**

Con amor y cariño dedico el siguiente trabajo:

Primeramente a Dios, por guiarme y bendecirme en todo este proceso de aprendizaje, para llegar a ser un buen profesional.

A mi madre Manuela Ruiz, quien me ha brindado todo su apoyo incondicional para completar una de mis metas propuestas; por enseñarme a no caer y siempre mejorar, por todos sus buenos consejos y valores que me ha conferido a través de todos estos años.

A Carlos Idrobo, por ser mi pilar y compañero de vida, al estar a mi lado siempre apoyandome en cada paso. Tu confianza y amor me han dado la fuerza para seguir adelante en los momentos más difíciles. Agradecerte que por tus conocimientos y experiencia profesional apoyaste y guiaste esta investigación.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Estatal de Milagro, por su arduo trabajo al forjar profesionales ejemplares al servicio de la comunidad, y por su constancia de innovación en nuevas especializaciones que permiten alcanzar el éxito a los nuevos profesionales.

A todos los docentes involucrados en el posgrado de biotecnología, por impartirnos sus conocimientos y experiencias.

A mi tutor de tesis M.Sc. César Stalin Gavin Moyano por sus conocimientos, orientaciones, su manera de trabajo al guiarme en el desarrollo de la investigación.

## Resumen

La presente investigación se enfoca en la evaluación de la eficiencia de *Pseudomonas koreensis* para la biorremediación de suelos contaminados con diésel, un hidrocarburo que representa un desafío ambiental significativo. La investigación se justifica por la creciente preocupación sobre la contaminación del suelo causada por actividades humanas, como la extracción y transporte de hidrocarburos, que han llevado a una degradación considerable de los ecosistemas a nivel nacional e internacional. A través de una metodología que incluye el aislamiento microbiológico de *Pseudomonas koreensis*, recolectada de la rizosfera de suelo de páramo andino del Parque Nacional Cajas, la identificación mediante la técnica de espectrometría de masas (MALDI-TOF), y la evaluación de su eficiencia en suelo contaminado con diesel, determinado a partir de un análisis de laboratorio de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH).

Los resultados obtenidos muestran la existencia de la cepa bacteriana en páramo andino ecuatoriano. El ensayo in situ determinó que, el tratamiento con la especie *Pseudomonas koreensis* tuvo una eficiencia de 52,856 % en relación al testigo, brindando resultados prometedores para futuros procesos de biorremediación a gran escala de suelo contaminado con hidrocarburos. En cambio, se obtuvo que no existió una disminución evidente en el tratamiento con *Pseudomonas koreensis* para descomponer plomo del suelo.

**Palabras Clave:** Biorremediación, *Pseudomonas koreensis*, Hidrocarburos totales de petróleo, Espectrometría de masas.

## Abstract

The present research focuses on the evaluation of the efficiency of *Pseudomonas koreensis* for the bioremediation of soils contaminated with diesel, a hydrocarbon that represents a significant environmental challenge. The research is justified by the growing concern about soil contamination caused by human activities, such as the extraction and transport of hydrocarbons, which have led to considerable degradation of ecosystems at national and international levels. Through a methodology that includes the microbiological isolation of *Pseudomonas koreensis*, collected from the rhizosphere of the Andean moorland soil of the Cajas National Park, the identification by mass spectrometry technique (MALDI-TOF), and the evaluation of its efficiency in soil contaminated with diesel, determined from a laboratory analysis of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH).

The results obtained show the existence of the bacterial strain in the Ecuadorian Andean moorland. The in situ test determined that the treatment with the species *Pseudomonas koreensis* had an efficiency of 52.856% in relation to the control, providing promising results for future large-scale bioremediation processes of soil contaminated with hydrocarbons. In contrast, it was found that there was no evident decrease in the treatment with *Pseudomonas koreensis* in decomposing lead from the soil.

**Keywords:** Bioremediation, *Pseudomona koreensis*, Total petroleum hydrocarbons, Mass spectrometry



## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> Área de estudio .....	29
<b>Figura 2</b> Mediciones de pH.....	38

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1</b> Parámetros y métodos aceptados para suelos contaminados con hidrocarburos.....	16
<b>Tabla 2</b> Límites permisibles para diversos contaminantes en suelos.....	18
<b>Tabla 3</b> Ubicación geográfica de los sitios de muestreo.....	28
<b>Tabla 4</b> Resultados del proceso de aislamiento e identificación .....	37
<b>Tabla 5</b> Prueba de normalidad.....	39
<b>Tabla 6</b> Prueba de Mann-Whitney .....	39
<b>Tabla 7</b> Resultados de eficiencia para cada uno de los tratamientos .....	40
<b>Tabla 8</b> Análisis de Plomo para los tratamientos efectuados.....	41
<b>Tabla 9</b> Resultados de eficiencia para cada uno de los tratamientos .....	41
<b>Tabla 10</b> Variables climáticas externas .....	42

## Lista de Anexos

<b>Anexo A</b> Certificado procesamiento de muestra .....	57
<b>Anexo B</b> Reporte de Análisis Microbiológico .....	58
<b>Anexo C</b> Perfil espectro métrico de identificación de <i>Pseudomonas koreensis</i> obtenido a través de espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF ) .....	59
<b>Anexo D</b> Análisis de Hidrocarburos Totales de Petróleo.....	60
<b>Anexo E</b> Análisis de plomo en suelo contaminado con hidrocarburo .....	63
<b>Anexo F</b> Registro Fotográfico .....	64

## Índice / Sumario

Derechos de Autor.....	i
Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación.....	ii
Certificación de Defensa.....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Resumen.....	vi
Abstract .....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas .....	ix
Lista de Anexos.....	x
Índice / Sumario .....	xi
Introducción .....	1
CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación.....	4
1.1 Planteamiento del problema .....	4
1.2 Delimitación del problema .....	5
1.3 Formulación del problema.....	6
1.4 Preguntas de investigación .....	6

1.5	Objetivos.....	7
1.6	Hipótesis .....	7
1.7	Justificación .....	7
1.8	Declaración de las variables (Operacionalización) .....	9
CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial .....		1
2.1.	Antecedentes Referenciales .....	1
2.2.	Contenido teórico que fundamenta la investigación.....	2
CAPÍTULO III: Diseño Metodológico.....		27
3.1	Tipo y diseño de investigación .....	27
3.2	La población y la muestra.....	27
3.3.1	Población.....	27
3.2.2	Muestra .....	27
3.3	Los métodos y las técnicas .....	27
3.3.1	Identificación microbiana de la rizosfera de páramo andino para la obtención de la especie <i>Pseudomona koreensis</i> .....	27
3.3.1.1	Obtención de muestras .....	27
3.3.2	Caracterización de los microorganismos del suelo rizosférico .....	29
3.1.2.1	Acondicionamiento preliminar .....	29

3.3.2.3	Identificación y caracterización de la microbiota de la rizosfera con el objetivo de aislar la especie <i>Pseudomona koreensis</i> .....	30
3.3.2.4	Identificación preliminar de <i>Pseudomonas</i> .....	31
3.3.2.5	Identificación fenotípica automática basada en el análisis del perfil de proteínas ribosomales utilizando la técnica de Espectrometría de Masas por Ionización con Láser Asistida por Matriz y Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF).....	31
3.3.2.6	Preservación de la cepa .....	32
3.3.3	Evaluar el potencial de <i>Pseudomonas koreensis</i> como agente biorremediador en suelos impactados por derrames de combustible diésel.....	32
3.3.3.1	Activación y preparación de la cepa.....	32
3.3.3.2	Montaje del ensayo .....	33
3.4	Procesamiento estadístico de la información .....	35
CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados.....		36
4.1.	Análisis e Interpretación de Resultados.....	36
4.1.1	Resultado del aislamiento e identificación de la bacteria <i>Pseudomonas koreensis</i> , procedente de páramo andino del Parque Nacional Cajas .....	36
4.1.2	Resultado del ensayo in situ que permite determinar la eficiencia de la especie <i>Pseudomonas koreensis</i> en la biorremediación de suelo contaminado con diésel.....	38
4.1.2.1	Medición de pH in situ .....	38
4.1.3	Análisis de hidrocarburos totales de petróleo (TPH).....	39

4.1.4	Análisis de Plomo.....	40
4.1.5	Resultados del promedio obtenido de las variables externas.....	42
CAPÍTULO V: Conclusiones, Discusión y Recomendaciones .....		43
5.1.	Discusión .....	43
5.2	Conclusiones.....	47
5.3	Recomendaciones .....	48
Referencias Bibliográficas .....		49
Anexos.....		57

## Introducción

Dado que la contaminación del suelo por hidrocarburos es principalmente el resultado de las acciones humanas, como la extracción, transporte, refinación y almacenamiento del petróleo y sus productos derivados, es una preocupación ambiental importante. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la extracción de petróleo es uno de los sistemas de producción más importantes y la principal fuente de ingresos de la economía (Zamora et al., 2012).

La contaminación producida por TPH (Hidrocarburos Totales Policíclicos) y HAPs (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos), debido a que son compuestos orgánicos formados principalmente por átomos de carbono e hidrógeno, al derramarse o filtrarse en el suelo, alteran su composición y afectan su estructura y biodiversidad, todos estos procesos están relacionados a los problemas globales como la reducción de la capa de ozono, pérdida de la biodiversidad, aumento excesivo de la contaminación atmosférica, desertización, que en conjunto aumentan el efecto invernadero e inducen al aceleramiento del cambio climático global (Amaringo et al., 2019).

La comprensión de las tecnologías emergentes ha hecho que sea esencial desarrollar e implementar nuevas estrategias de remediación sostenibles. Como resultado, la biorremediación utiliza la biodegradación realizada por microorganismos para depurar contaminantes (Hernández, 2016).

La biorremediación es un método que utiliza microorganismos, ya sean nativos o introducidos, como bacterias, hongos, plantas y algas, con habilidades metabólicas para desintoxicar o neutralizar materiales tóxicos en un entorno. Estos organismos transforman las



sustancias peligrosas en sustancias menos peligrosas, lo que facilita su eliminación mediante métodos más fáciles (Hernández, 2016).

La investigación se centra en la importancia de la biorremediación como un enfoque sostenible para eliminar contaminantes de suelos afectados por hidrocarburos, particularmente diésel, mediante el empleo de *Pseudomonas koreensis*, una especie bacteriana. Las implicaciones ambientales y de salud de las emisiones de diésel en el suelo son significativas, ya que tienen un impacto en la calidad del suelo, la biodiversidad y el equilibrio ecológico. El problema en Ecuador se debe principalmente a la explotación petrolera y minera, así como a la inadecuación de los residuos industriales, lo que ha provocado una importante contaminación en muchas zonas (Pérez, 2018).

El planteamiento del problema se centra en la evaluación de la capacidad de *Pseudomonas koreensis* para degradar los compuestos presentes en el diésel, sin controlar las condiciones ambientales. Se han realizado estudios previos sobre biorremediación, pero aún no hay datos precisos sobre la capacidad de esta bacteria para probar su eficiencia y adaptabilidad a suelos contaminados. La identificación y aislamiento de la especie bacteriana en suelos de páramo andino en el Parque Nacional Cajas y su evaluación como potencial biorremediador son parte del diseño experimental utilizado en la investigación.

El trabajo de investigación se divide en varios capítulos, presentando en el primero el problema de investigación y justificando la importancia y relevancia del estudio, junto con los objetivos que se deben alcanzar. El marco teórico es el foco del segundo capítulo, que proporciona el contexto científico y los antecedentes relevantes. El Capítulo III describe el diseño metodológico, que abarca la población de estudio, los métodos de muestreo y el análisis microbiológico. El Capítulo IV describe los hallazgos y evalúa la efectividad de

*Pseudomonas koreensis* en la biorremediación de suelos contaminados. El quinto capítulo concluye presentando las conclusiones y sugerencias, que tienen como objetivo mejorar y perfeccionar las técnicas de biorremediación mediante la utilización de cepas bacterianas.

## CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación

### 1.1 Planteamiento del problema

La contaminación de suelos por hidrocarburos, en particular el diésel, representa un desafío ambiental de gran relevancia, siendo este un problema ambiental significativo que afecta la calidad del suelo, la biodiversidad y el equilibrio ecológico (Acuña et al., 2004).

La presencia de hidrocarburos en el suelo tiene un impacto en la calidad del mismo, alterando sus propiedades tanto físicas como químicas, lo que puede resultar en una disminución de su fertilidad. Además, los hidrocarburos son compuestos orgánicos que pueden persistir en el medio ambiente, causando daños en la flora y fauna. Los contaminantes pueden afectar la estructura del suelo, reduciendo su capacidad para retener agua y nutrientes esenciales, lo que a su vez perjudica el crecimiento de vegetación (Cavazos et al., 2014).

La contaminación por diésel también tiene efectos en la biodiversidad causando consecuencias graves en los organismos del suelo, por ejemplo, lombrices, microorganismos, etc., provocando la alteración de su hábitat, lo que puede llevar a la disminución de su biodiversidad. La contaminación por hidrocarburos puede tener un impacto negativo en la salud de los ecosistemas en su conjunto, los ecosistemas contaminados pueden volverse menos resilientes ante cambios ambientales, como sequías o inundaciones, y pueden experimentar una disminución en su capacidad para proporcionar servicios ecosistémicos, como la purificación del agua y la regulación del clima (Romaniuk et al., 2017).

La explotación petrolera y minera en Ecuador, además del mal manejo de desechos industriales, ha dejado un legado de contaminación en diversas regiones, especialmente en la Amazonía, donde incluso la explotación petrolera es una de las principales causas de

deforestación en dicho lugar, debido a que en 37 años, desde 1985 hasta 2022, se perdieron 1.4 millones de hectáreas de bosque (Cordona, 2018). Desde el inicio de la actividad petrolera y minera, se han reportado derrames de crudo que han afectado gravemente el medio ambiente incluyendo la contaminación de suelos y fuentes de agua. Se estima que más de 650,000 barriles de petróleo han sido derramados, lo que ha llevado a la degradación de ecosistemas, hábitats y a la contaminación de suelos agrícolas (Vizúete et al., 2020).

Ecuador es el cuarto productor de hidrocarburos en América Latina y ha enfrentado graves problemas de contaminación e inclusive debido a la expansión de la población y al crecimiento industrial estas se han intensificado, por lo que la falta de biorremediación adecuada ha llevado a la acumulación de lodos contaminados con hidrocarburos y metales pesados, afectando gravemente la salud de las comunidades cercanas.

Algunas estadísticas alarmantes mencionan que la explotación petrolera en la Amazonía ecuatoriana es responsable de la deforestación de 2 millones de hectáreas (Vizúete et al., 2020), además que desde 1967 hasta 2022 se han registrado un total de 4,604 fuentes de contaminación relacionadas con el sector hidrocarburos en el país (Nuñez et al., 2023). Si bien se han remediado 2,839 de estas fuentes, todavía queda un 38% pendiente de remediar. Esto significa que casi 1,800 fuentes de contaminación aún no han sido limpiadas, lo cual representa un riesgo ambiental significativo (Sierra, 2023).

## **1.2 Delimitación del problema**

La contaminación del suelo con hidrocarburos es un problema importante, debido a los numerosos impactos adversos en el medio ambiente y la salud humana.

Para la presente investigación, se limitará al diésel como contaminante, excluyendo otros hidrocarburos o contaminantes químicos. Esto permitirá un enfoque más claro en la capacidad

de *Pseudomonas koreensis* para degradar específicamente este tipo de compuesto ya que el diésel es un hidrocarburo complejo que contiene principalmente cadenas de carbono que varían entre 12 y 24 átomos de carbono (Ramírez et al., 2012).

También está compuesto por hidrocarburos alifáticos lineales o ramificados, que son descompuestos por los microorganismos fácilmente. Igualmente, hidrocarburos aromáticos los cuales son más resistentes a la biodegradación, pero también pueden ser descompuestos por ciertas cepas bacterianas. Finalmente, la presencia de biodiésel que contiene ésteres de ácidos grasos, que facilitan la biodegradación de los hidrocarburos al aumentar la disponibilidad de nutrientes y actuar como un surfactante mejorando la solubilidad de los hidrocarburos en el medio (Ramírez et al., 2012).

### **1.3 Formulación del problema**

A pesar de los avances en el estudio de la biorremediación, aún se carece de información suficiente sobre la eficiencia de *Pseudomonas koreensis* en la degradación de contaminantes específicos como el diésel en suelos contaminados. La falta de datos sobre su capacidad de adaptación, mecanismos de degradación y efectividad en diferentes condiciones ambientales limita su aplicación práctica en proyectos de remediación.

### **1.4 Preguntas de investigación**

¿Cuál es la capacidad de *Pseudomonas koreensis* para degradar compuestos presentes en el diésel sin controlar condiciones?

¿Qué factores ambientales influyen en la eficiencia de *Pseudomonas koreensis* para la biorremediación de suelos contaminados con diésel?

¿Cómo se compara la eficiencia a de *Pseudomonas koreensis* con otras cepas bacterianas conocidas en la degradación de diésel?

## **1.5 Objetivos**

### **1.5.1 Objetivo general**

Evaluar la eficiencia de la especie *Pseudomonas koreensis* para la biorremediación de suelos contaminados con diésel, proveniente de páramo andino del Parque Nacional Cajas.

### **1.5.2 Objetivos específicos**

1. Aislar e identificar mediante la técnica de espectrometría de masas (MALDI-TOF) la especie *Pseudomonas koreensis*, proveniente de páramo andino del Parque Nacional Cajas.
2. Probar la eficiencia in situ de la especie *Pseudomonas koreensis* como potencial biorremediadora de suelos contaminados por diésel.

## **1.6 Hipótesis**

La aplicación de *Pseudomonas koreensis* favorecerá la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo, específicamente diésel.

## **1.7 Justificación**

La biorremediación, que utiliza microorganismos para degradar contaminantes, se presenta como una solución sostenible y efectiva para mitigar estos efectos.

La evaluación de la eficiencia del género *Pseudomonas* para la biorremediación es un estudio que aborda un problema ambiental crítico y que tiene el potencial de contribuir significativamente a la restauración ecológica y a la sostenibilidad de los recursos naturales. Este enfoque no solo apoya la ciencia ambiental, sino que también ofrece soluciones prácticas para la gestión de suelos contaminados, beneficiando a las comunidades locales y al medio ambiente en general.

Por lo tanto, la investigación se enfocará exclusivamente en la biorremediación con bacterias, especialmente del género *Pseudomonas*, debido a que pueden descomponer una amplia variedad de compuestos orgánicos, incluidos los hidrocarburos y pesticidas; Inclusive, por su versatilidad metabólica, que les permite utilizar estos contaminantes como fuente de carbono y energía. Además, *Pseudomonas* puede adaptarse a diferentes condiciones ambientales, lo que les permite prosperar en suelos y aguas contaminadas. Esta adaptabilidad es crucial para la biorremediación ya que los ambientes contaminados pueden variar considerablemente en pH, temperatura y contenido de nutrientes (Antona, 2015) .

*Pseudomonas koreensis*, conocida por su capacidad para degradar diversos compuestos orgánicos, incluidos los hidrocarburos, es un foco importante de este estudio. La evaluación de su eficiencia en la biorremediación implica analizar su capacidad para reducir la concentración de diésel en el suelo, así como su adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales y su interacción con otros microorganismos presentes en el ecosistema. Al comprender mejor estas características, se pueden desarrollar estrategias más efectivas para utilizar *Pseudomona koreensis* en proyectos de biorremediación, contribuyendo así a la restauración de suelos contaminados de manera sostenible y respetuosa con el medio ambiente (Mayz & Manzi, 2017).

Además, la elección de *Pseudomonas koreensis*, también se basa en su capacidad demostrada para producir biosurfactantes, que son compuestos que aumentan la solubilidad y biodisponibilidad de los hidrocarburos en el medio ambiente, facilitando su degradación por parte de los microorganismos (Antona, 2015) . Estudios previos han indicado que especies del género *Pseudomonas* son altamente eficaces en la degradación de hidrocarburos, lo que

sugiere que dicha especie bacteriana podría ser una opción viable para la biorremediación de suelos contaminados con diésel (Conde et al., 2021).

Por consiguiente, esta investigación puede contribuir a la mejora de las técnicas de remediación biológica. Abordar estos problemas permitirá no solo entender mejor el potencial de esta bacteria, sino también optimizar su uso en estrategias de biorremediación más amplias y efectivas.

Asimismo, la investigación no solo tiene implicaciones científicas, sino también sociales y económicas. La biorremediación representa una alternativa ecológica y sostenible frente a métodos más invasivos y costosos. Al restaurar la calidad del suelo, se protege la flora y fauna, se favorece el equilibrio del ecosistema y se promueve el uso sostenible de los recursos naturales, lo que es crucial para las comunidades que dependen de estos ecosistemas para su subsistencia.

## **1.8 Declaración de las variables (Operacionalización)**

### **Variable Dependiente:**

Potencial Hidrógeno (pH)

Hidrocarburos totales de petróleo (TPH)

Metales pesados

### **Variable Independiente:**

Pseudomonas Koreensis

Factores Climáticos



## CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial

### 2.1. Antecedentes Referenciales

La investigación realizada por Huayasco (2020), demostró que la inoculación con bacterias del género *Pseudomonas spp.* aisladas del mismo suelo contaminado mejoraron significativamente la biorremediación de los hidrocarburos, mostrando un vínculo directo entre la presencia de estas bacterias y la degradación de los contaminantes en el suelo.

La investigación sobre la “Caracterización microbiológica de suelos contaminados por hidrocarburos en el sector del Río Bonanza en la provincia de Pastaza, Ecuador”, realizada por Maposita et al., (2011) aislaron bacterias con capacidad para biodegradar fracciones de petróleo como *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia rubidae*, *Bacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Spirillum sp.*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes sp.*

El propósito de la investigación era caracterizar, aislar e identificar bacterias capaces de crecer sobre hidrocarburos; estas bacterias podrían ser reintroducidas en áreas contaminadas con el fin de neutralizar sustancias tóxicas y convertirlas en compuestos menos perjudiciales para el medio ambiente. Además, tuvo implicaciones sociales y ambientales ya que los resultados de este estudio podrían sustentar el desarrollo y cumplimiento de leyes ambientales más estrictas para regular las operaciones petroleras en la Amazonía y esta investigación buscaba mitigar los daños causados por la explotación petrolera en el aire, recursos hídricos, flora y fauna de la región amazónica.

El estudio realizado por Bracho y Soto (2004), denominado “Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por *Pseudomonas spp.*”. El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Acuática de la Universidad del Zulia, Venezuela, y examinó la habilidad de 14 cepas de *Pseudomonas* para eliminar hidrocarburos

policíclicos y heterocíclicos, en particular dibenzotiofeno, antraceno, fenantreno y naftaleno, que forman parte de la fracción aromática del petróleo.

En esta investigación se descubrió que el antraceno y el naftaleno podían ser degradados por el 100% de las cepas. El grado del fenantreno es del 78.57%, mientras que el dibenzotiofeno es del 71.42%. El 50% de las cepas pudieron degradar los cuatro hidrocarburos analizados.

De la Cruz (2022), realizó una investigación sistemática sobre la eficiencia del grupo bacteriano *Pseudomonas* en la biorremediación de suelos, en la cual utilizó bases de datos como Web of Science y Scopus para analizar 485 estudios publicados entre 2018 y 2022. El propósito principal fue descubrir cómo estas bacterias pueden contribuir a disminuir la contaminación del suelo, un problema importante debido a la toxicidad y la degradación difícil de los hidrocarburos.

Los resultados obtenidos con un período de incubación de 2 a 30 días y una aplicabilidad en el suelo de hasta 90 días, las especies de *Pseudomonas* examinadas demostraron capacidad de crecimiento en un rango de pH neutro y temperaturas entre 10°C y 37.5°C. En algunos casos, el porcentaje de eliminación de hidrocarburos llegó al 92.40%, lo cual demuestra que estas bacterias son muy efectivas en la eliminación de contaminantes.

## **2.2. Contenido teórico que fundamenta la investigación**

### **2.1.1 Hidrocarburos**

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos únicamente compuestos de átomos de hidrógeno y carbono. Debido a que muchos otros compuestos complejos se derivan de ellos, se consideran los compuestos más simples y fundamentales en la química orgánica. En la

naturaleza, los hidrocarburos existen en una variedad de formas: gases (como el gas natural), líquidos (como el petróleo) y sólidos (como los hidratos de metano) (Acuña et al., 2004).

### **2.2.1.2 Hidrocarburos Totales Policíclicos (TPHs)**

La estructura química de los TPHs se compone de dos o más anillos de benceno fusionados. Los TPHs tienen una alta estabilidad química y una baja solubilidad en agua debido a esta estructura, lo que contribuye a su persistencia en el medio ambiente. En el petróleo crudo o refinado no es factible medir cada uno de estos componentes de manera independiente; por lo tanto, se calcula la cantidad total de hidrocarburos policíclicos en un lugar específico (Moreira, 2023).

Las condiciones ambientales particulares de un ambiente contaminado pueden afectar la descomposición de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (TPH). Para garantizar la eficacia de la actividad de los microorganismos responsables de la degradación, es fundamental monitorear estas condiciones (Vallejo et al., 2005). Los siguientes son algunos de los principales factores que afectan la biodegradación de TPH: La temperatura ideal para la actividad microbiana que descompone TPH es de entre 20 y 30 grados centígrados. El crecimiento y la actividad de estos microorganismos pueden verse obstaculizados por temperaturas extremas, ya sean muy altas o muy bajas (Romaniuk et al., 2017) .

Para que la mayoría de las bacterias y hongos degradantes biodegraden el TPH, el pH del suelo o del agua contaminado debe estar entre ligeramente ácido y neutro (pH 6-8). Para mantener la actividad microbiana y facilitar el transporte de oxígeno y nutrientes, es necesario un nivel adecuado de humedad, que suele estar entre el 50-80% de la capacidad de campo. La falta de nitrógeno (N) y fósforo (P) para el metabolismo microbiano puede resultar

de la alta concentración de carbono de los TPH después de un derrame de petróleo (Vallejo et al., 2005).

Para que los microorganismos puedan degradar los TPH de manera efectiva, es necesario que existan aceptores de electrones, como el oxígeno en condiciones aerobias u otros compuestos oxidados, como los nitratos, los sulfatos o el hierro en condiciones anaerobias (Vallejo et al., 2005).

### **2.2.1.3 Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HAPs)**

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAP) son estructuras complejas que se componen de varios anillos bencénicos fusionados. La disposición de sus anillos en configuraciones agrupadas o angulares los distingue como componentes importantes del petróleo. La resonancia de los electrones en sus anillos aromáticos bencénicos le da una gran resistencia a la oxidación, tanto química como biológica, lo que explica su estabilidad química. Su alta toxicidad y su persistencia en el medio ambiente se deben a esta estabilidad (Scott et al., 2012).

Los HAP provienen de una variedad de fuentes, tanto naturales como antropogénicas. La quema de combustibles fósiles, como carbón, petróleo y gas natural, es una de las principales fuentes de emisión. Incineración de desechos, como la quema de basura y otros materiales orgánicos. actividades industriales como procesos como la fabricación de aluminio y coque. La emisión de HAP se ve significativamente aumentada por incendios forestales como la combustión de biomasa (Zhang et al., 2023).

Entender su comportamiento en el medio ambiente y su impacto en la salud humana depende de las características físico-químicas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

La hidrofobicidad y la recalcitrancia son características que se ven afectadas por la cantidad de anillos bencénicos presentes en su estructura (Ortiz et al., 2012).

La capacidad de un compuesto para resistir la degradación biológica, química y física que puede experimentar en el medio ambiente se conoce como recalcitrante. Esta propiedad se explica por su estructura aromática. Los HAP con múltiples anillos bencénicos tienen una estructura más estable y son menos susceptibles a la degradación natural. Cada anillo adicional en la estructura aumenta la estabilidad del compuesto y lo hace más resistente a la oxidación y los microorganismos que lo descomponen. Esta resistencia prolonga la vida útil de los HAP en el medio ambiente y ayuda en su persistencia y acumulación (Ortiz et al., 2012).

Una característica esencial que afecta cómo actúan los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el medio ambiente es la hidrofobicidad, que es la resistencia al agua. Los HAPs son insolubles en agua debido a su estructura química que contiene anillos bencénicos altamente no polares. En vez de disolverse en el agua, tienden a adherirse a superficies sólidas, como sedimentos y partículas de suelo, debido a esta característica. Esta adsorción fomenta la acumulación de los HAPs en el ambiente, a pesar de que puede limitar su movilidad (Ortiz et al., 2012).

El metabolito de *Pseudomonas* es capaz de convertir los hidrocarburos aromáticos policíclicos en compuestos liposolubles. Esto facilita su rápida propagación en los tejidos celulares bacterianos y su absorción. Debido a su capacidad para unirse al ADN después de su activación biológica, los HAP como el benzofluoranteno, el benzopireno, el benzoantraceno y el dibenzoantraceno tienen el potencial de ser mutagénicos y carcinogénicos (Álvarez et al., 2015).

## **2.2.2 Origen de las fuentes de contaminación del suelo por hidrocarburos**

Se conocen como fuentes de contaminación las entidades, procedimientos o actividades que causan la degradación del medio ambiente. La contaminación del suelo por hidrocarburos puede manifestarse de manera puntual, caracterizada por emisiones concentradas en una región determinada, o de forma difusa, caracterizada por la dispersión de los contaminantes por un extenso rango geográfico.

- **Fuentes Puntuales**

Las fuentes de contaminación puntuales son aquellas que tienen una fuente específica y fácilmente identificable. Estas fuentes suelen ser actividades o instalaciones que emiten contaminantes en un lugar específico, lo que facilita su control y monitoreo. Estos son ejemplos: Fábricas y plantas industriales, son lugares donde se generan los residuos contaminantes. Las estaciones de tratamiento de aguas residuales, estas instalaciones tienen el potencial de liberar contaminantes en cuerpos de agua. Los derrames de petróleo, ocurren en un lugar específico, como en el transporte de hidrocarburos o en un puerto (Abellán et al., 2002).

- **Fuentes Difusas**

Sin embargo, las fuentes difusas tienen contaminantes que se extienden por un área más amplia y no tienen un punto de origen claro. Esto dificulta la identificación y el control de la contaminación. Estos son algunos ejemplos: Escorrentía agrícola, es cuando los fertilizantes y pesticidas se filtran en el agua y el suelo. La contaminación atmosférica es causada por una variedad de fuentes, incluidos vehículos, actividades industriales dispersas. La contaminación urbana es el resultado de diversas actividades que ocurren en las ciudades, como el uso de productos químicos en el hogar (Hurtado, 2020).

### 2.2.3 Origen del diésel en el suelo

Un hidrocarburo líquido que se produce principalmente por destilación del petróleo es el diésel. Su estructura química con fórmulas que oscilan entre  $C_{10}H_{22}$  y  $C_{15}H_{32}$ , siendo la media aproximada  $C_{12}H_{23}$ , se basa en una combinación de hidrocarburos, principalmente parafinas. La densidad de esta mezcla es superior a  $850 \text{ kg/m}^3$  ( $0.85 \text{ g/cm}^3$  a  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ ), y contiene aproximadamente tres cuartas partes de hidrocarburos aromáticos y tres cuartas partes de hidrocarburos saturados (Castillo et al., 2012).

#### 2.2.3.1 Fuentes de Contaminación por Diésel en el Suelo

Se pueden distinguir dos grupos principales de fuentes para introducir el diésel en el suelo: las fuentes naturales y las antropogénicas.

- **Fuentes Antropogénicas**

Los derrames de diésel en maquinaria, transporte y almacenamiento son las causas más comunes de contaminación; Estos pueden ser el resultado de accidentes de tránsito, errores en la manipulación del combustible o fallas en los tanques de almacenamiento (Cavazos et al., 2014).

Las fugas en los sistemas de tuberías, los tanques subterráneos y otras infraestructuras de almacenamiento también pueden provocar la filtración de diésel en el suelo. Si no se controlan a tiempo, estas filtraciones pueden causar una contaminación significativa y son frecuentemente difíciles de detectar. Entre otras prácticas inadecuadas de disposición de desechos, el vertido ilegal de productos derivados y de petróleo contribuye a la contaminación del suelo por diésel (Cavazos et al., 2014).

- **Fuentes Naturales**

Como resultado de la migración del petróleo desde depósitos subterráneos, algunas formas de hidrocarburos, incluyendo componentes similares al diésel, pueden estar presentes naturalmente en el suelo. No obstante, estas fuentes naturales son menos comunes que las fuentes antropogénicas (Cavazos et al., 2014).

### **2.2.3.2 Comportamiento del Diésel en el Suelo**

La composición química del combustible, las características del suelo y las condiciones ambientales son factores que afectan el comportamiento del diésel en el suelo.

- **Composición Química**

La mezcla compleja de hidrocarburos aromáticos y alifáticos constituye el diésel. Mientras que los componentes más pesados, como los compuestos aromáticos policíclicos, pueden permanecer en el suelo durante largos períodos de tiempo, los más ligeros tienden a volatilizarse rápidamente. Debido a su toxicidad y capacidad para bioacumularse, son particularmente preocupantes estos compuestos más pesados (Carvajal et al., 2017).

- **Propiedades del Suelo**

El pH del suelo, la porosidad, la textura y el contenido de materia orgánica son factores importantes que afectan la movilidad y la retención del diésel. Por ejemplo, los suelos con una gran cantidad de materia orgánica tienen la capacidad de adsorber más hidrocarburos, lo que disminuye su movilidad, pero dificulta su remediación. Por otro lado, los suelos arenosos facilitan la percolación y dispersión de los contaminantes (Carvajal et al., 2017).

- **Factores Ambientales**

La degradación del diésel en el suelo está influenciada por la humedad, la temperatura y la presencia de microorganismos. Los hidrocarburos se descomponen en compuestos menos



tóxicos por medio de microorganismos como bacterias y hongos; este proceso es fundamental para la remediación natural. La falta de oxígeno, o condiciones anaeróbicas, pueden retrasar este proceso y aumentar la persistencia del contaminante (Carvajal et al., 2017).

## **2.2.4 Impactos Ambientales y en la Salud**

Los efectos negativos de la contaminación del suelo por diésel pueden ser múltiples. Afectando la biodiversidad del suelo, los hidrocarburos del diésel pueden ser perjudiciales para la flora y la fauna. La exposición a suelos contaminados, ya sea por medio del contacto directo o del consumo de agua y alimentos contaminados, puede provocar efectos perjudiciales en la salud, como el cáncer y los trastornos respiratorios (Zamora et al., 2012).

### **2.2.4.1 Efectos de los hidrocarburos en el suelo**

Los contaminantes que provienen de los hidrocarburos se esparcen gradualmente por el suelo, tanto en las capas superficiales como en las subsuperficiales. Los factores que afectan este proceso incluyen la exposición de los hidrocarburos a las fases sólida, gaseosa y acuosa del suelo, lo que provoca una separación natural de sus distintas partes. Debido a su menor movilidad en el suelo, los compuestos de alto peso molecular suelen permanecer cerca de la fuente de contaminación (Zamora et al., 2012). En cambio, las sustancias más ligeras y solubles en agua migran hacia capas más profundas del perfil del suelo. Por su interacción con las distintas fases del suelo (sólida, gaseosa y acuosa), los contaminantes se dispersan a lo largo del perfil del suelo, tanto en la superficie como en las capas subsuperficiales (Martínez et al., 2011).

La proporción del espacio poroso que ocupan estos compuestos disminuye cuando la cantidad de hidrocarburos disminuye, ya sea por medio de la disolución u otros métodos de eliminación. Esto limita la capacidad de movimiento de la fase orgánica, ya que los pasajes

entre los poros se vuelven más estrechos y complejos. La saturación residual es la fase no acuosa del suelo que ocurre cuando el volumen del suelo ya no es suficiente para permitir la migración (Martínez et al., 2011).

El tipo y el volumen de hidrocarburo, así como las características físicas, químicas y microbiológicas del suelo, determinan los efectos más significativos que los hidrocarburos tienen en el suelo. También son importantes los elementos climáticos como la temperatura, la humedad y otros factores ambientales. La propagación y la extensión de la contaminación en un área determinada por todas estas variables en conjunto. Los efectos más perjudiciales que el suelo puede sufrir incluyen (Benavides et al., 2006):

- Pérdida de calidad de los productos obtenidos y disminución del rendimiento de los cultivos.
- Retarda o impide el desarrollo de la vegetación en las zonas contaminadas.
- Cambios en la población de microbios del suelo.
- La escorrentía causa la contaminación de aguas superficiales.
- Los lixiviados contaminan las aguas subterráneas.
- Envenenamiento que se propaga a través de la cadena alimentaria.
- Una disminución o anulación de su poder autodepurante ocurre cuando la concentración de los contaminantes supera la capacidad de aceptación del suelo.
- El impacto en el paisaje de la zona donde se encuentra la matriz contaminada.
- Se inician una serie de procesos físicos - químicos en simultáneo para evitar el intercambio gaseoso con la atmósfera.
- Enzimas desnaturalizadas, células deshidratadas y la estructura terciaria de las proteínas pueden ser destruidas por los altos desniveles de salinidad.

Los hidrocarburos ligeros afectan más a la microflora del suelo al penetrar en las capas freáticas; por otro lado, los hidrocarburos más pesados son menos dañinos a corto plazo, pero permanecen en el ambiente durante mucho más tiempo. Los sólidos, permanecen en la superficie o son transportados a tierras más bajas, mientras que los compuestos solventes se filtran (Zamora et al., 2012).

#### **2.2.4.2 Efectos de los hidrocarburos en la salud**

Los efectos de los hidrocarburos en los seres vivos son muy variados y dependen de varios factores, como el tipo de compuesto químico, la cantidad vertida y el tiempo de exposición. Debido a que contiene un bajo contenido de compuestos polares y una gran cantidad de hidrocarburos saturados, los combustibles ligeros como la gasolina y el queroseno son más tóxicos que los combustibles medianos y pesados, como el diésel; su mayor volatilidad incrementa el contacto físico entre el contaminante y las células microbianas (Mastandrea et al., 2005).

Cuando se inhalan y se consumen con los alimentos, el agua y el contacto directo pueden ser los medios por los cuales los hidrocarburos ingresan al cuerpo de las personas. Los contaminantes son absorbidos más rápidamente que cuando son inhalados o ingeridos cuando ingresan por vía dérmica (Mastandrea et al., 2005).

Después de ingresar, se esparcen ampliamente por la sangre y se transforman rápidamente en compuestos químicos. El tipo, la composición y la cantidad expuesta de hidrocarburos determinan si son más o menos dañinos. La mayoría de los hidrocarburos salen del cuerpo a través de la orina o el aire exhalado (Solá et al., 2018).

Los componentes de hidrocarburos de bajo peso molecular tienen un impacto en el sistema nervioso central y pueden causar irritación de la piel, dolores de cabeza, náuseas, hormigueos en manos y pies. La exposición excesiva a estos componentes puede causar la muerte (Solá et al., 2018).

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos, principalmente debido a sus efectos cancerígenos, son los principales riesgos asociados con las altas concentraciones de hidrocarburos. El benceno es responsable de causar cáncer (leucemia) en humanos, así como la gasolina y los benzopirenos se consideran cancerígenos (Solá et al., 2018).

Los metales pesados como el cadmio, cromo, plomo, magnesio, cobalto y cobre pueden causar diversas enfermedades, acumularse y causar irritación de la piel, problemas reproductivos y cáncer. Es esencial considerar los procesos de intemperización porque cambian la composición de los productos y pueden afectar los resultados, la capacidad de biorremediación y la toxicidad del producto que se libera al medio ambiente (Solá et al., 2018).

### **2.2.5 Impacto Ambiental de los Metales**

Desde la exploración y fabricación hasta la industrialización, el almacenamiento, el transporte y la comercialización, los metales se encuentran en diferentes fases de la industria petrolera. Los ripsos y lixiviados producidos por los aditivos del lodo durante la fase de perforación son los principales factores que contribuyen a la contaminación por metales. (RAHOE, 2001) indica que estos residuos contienen una variedad de metales.

El níquel, un metal dorado y brillante, representa el 0,008% de la corteza terrestre. A temperatura ambiente, es magnético; tiene una resistencia aceptable a la fusión en caliente y

alcanza su punto de fusión a 1455°C. Además, el organismo humano contiene pequeñas cantidades de níquel (Quintero et al., 2012).

El níquel es liberado al aire por los incineradores de desechos y las centrales eléctricas; la lluvia lo lleva al suelo. Antes de que se elimine, el níquel puede permanecer en el aire durante un largo período. Puede alcanzar las superficies acuáticas cuando se combina con las aguas residuales. Los sedimentos o partículas del suelo absorben e inmovilizan la mayor parte de los compuestos de níquel que ingresan al medio ambiente. No obstante, el níquel puede alcanzar las aguas subterráneas y se vuelve más móvil en suelos ácidos (Quintero et al., 2012).

El cadmio se absorbe principalmente por medio de los alimentos. En las personas que fuman, la exposición al cadmio aumenta considerablemente. La descomposición de las rocas libera aproximadamente la mitad del cadmio en los ríos, mientras que una parte se libera al aire por los incendios forestales y las erupciones volcánicas. Además, los derrames y/o descargas, así como la producción de materias primas y la industria petrolera, contribuyen a la liberación de cadmio (García & Cruz, 2012).

La corteza terrestre contiene naturalmente plomo, un metal con un punto de fusión bajo. No obstante, es difícil encontrarlo en su forma completa de metal. Se presenta con frecuencia en conjunto con otros componentes para crear compuestos de plomo. Sin embargo, la mayor parte de los niveles elevados de plomo en el ambiente son el resultado de las acciones humanas (OPS & OMS, 2020).

Las minas y fábricas de plomo, así como otros metales que producen o utilizan plomo, aleaciones de plomo o compuestos de plomo, pueden permitir que el plomo ingrese al medio ambiente. Al quemar carbón, petróleo o basura, el plomo se libera al aire. El plomo se adhiere

firmemente a las partículas del suelo cuando cae al suelo y se mantiene en la capa superior del suelo (Jaramillo et al., 2018).

Esta es la razón por la que el uso anterior de plomo, como en la gasolina, la pintura y los pesticidas con plomo, ha tenido un impacto tan significativo en los niveles de plomo en el suelo. Cuando el agua de lluvia mueve las partículas del suelo, pequeñas cantidades de plomo ingresan a los ríos, lagos y arroyos (Jaramillo et al., 2018).

### **2.2.6 Normativas y Regulaciones en el Ecuador**

En el año 2001, se emitió el Reglamento Sustitutivo del Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador (RAOHE), con el fin de establecer regulaciones claras en cuanto a la situación social y ambiental para todas las etapas de operación de la industria petrolera (RAOHE, 2001).

El RAOHE trabaja directamente con la industria petrolera para adoptar normas constitucionales y legales y modelos ambientales reconocidos a nivel nacional e internacional (RAOHE, 2001).

Las regulaciones de gestión ambiental del país son bastante nuevas desde el primer acuerdo llamado "Acuerdo de Caballeros" en 1990. En 1992 se acordó otro acuerdo y en 1995 se emitió un Decreto Ejecutivo antes de que se emitiera el reglamento. En Ecuador, las operaciones petrolíferas comenzaron en 1911 en la Península de Santa Elena. Por lo tanto, se necesitaron casi 80 años para tener una regulación clara sobre la gestión ambiental en las actividades hidrocarburíferas (RAOHE, 2001).

En el artículo 86 del RAOHE de 2001 se establecen los límites permitidos para las descargas líquidas, emisiones a la atmósfera y disposición de desechos sólidos en el

ambiente. Estos límites se establecen en los Anexos No. 1, 2 y 3 del Reglamento, que conforman el programa mínimo para el monitoreo ambiental interno y se informarán a la Subsecretaría de Protección Ambiental (RAHOE, 2001).

Si se supera el límite permitido en los anexos, se debe notificar de inmediato a la Subsecretaría de Protección Ambiental y justificar las medidas correctivas tomadas.

b.4) Tabla No. 6: Límites permitidos para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las etapas de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicio (RAOHE, 2001).

El artículo 59 sobre monitoreo ambiental interno y el artículo 62 sobre condiciones de monitoreo ambiental en la sección "Mecanismos de control y seguimiento ambiental" del nuevo Reglamento (RAOH) establecen que "debe ser menor al límite máximo permisible establecido en las normas técnicas", pero las normas técnicas para la identificación y remediación de suelos contaminados que se encuentran en las fases de la industria no están anexadas (RAOH, 2020)

El RAOH establece límites para la remediación del suelo que incluyen un seguimiento del suelo in situ y la recolección de muestras a intervalos regulares. Las técnicas empleadas para evaluar cada parámetro se muestran en la Tabla 1 las cuales se ajustan a las normas del INEN.

**Tabla 1***Parámetros y métodos aceptados para suelos contaminados con hidrocarburos*

Parámetro	Unidad	Uso	Uso	Ecosistemas	Método
		agrícola	Industrial	Sensibles	
Hidrocarburos totales (TPH)	mg/kg	<2500	<4000	<1000	Extracción con cloruro de metileno, cromatografía de gases y determinación FID (GC/FID).
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)	mg/kg	<2	<5	<1	Extracción; determinación por cromatografía de gases (GC) o HPLC.
Cadmio (Cd)	mg/kg	<2	<10	<1	Digestión ácida de la muestra y determinación directa por espectroscopia de absorción atómica.
Níquel (Ni)	mg/kg	<50	<100	<40	
Plomo (Pb)	mg/kg	<100	<500	<80	

En cuanto a los suelos contaminados por hidrocarburos, se aplican las siguientes normas, las cuales se encargan de caracterizar y calcular sus parámetros (INEN, 2023):

- NTE INEN-ISO 14154; revisión más reciente 2014; título: “Calidad del suelo. Determinación de algunos clorofenoles seleccionados. Método de cromatografía de gases con detector de captura electrónica (ISO 14154:2005, IDT)”
- NTE INEN-ISO 10381-7; revisión más reciente de 2014: “Calidad del suelo. Muestreo. Parte 7: líneas directrices para el muestreo del gas del suelo (ISO 10381-7:2005, IDT)”



- "Productos de petróleo. Informe de NTE INEN 2146 de 2013 sobre la determinación del tipo de hidrocarburos utilizando un indicador de adsorción fluorescente (FIA) a altas temperaturas.
- "Código de prácticas para reducir la contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en los alimentos producidos por procedimientos de ahumado y secado directo" del año 2013, con el nombre de CPE INEN-CPDEX CAC/RCP 68.
- "Compuestos líquidos de petróleo". Determinación del contenido de compuestos oxigenados de la gasolina y de los grupos de hidrocarburos. Método de cromatografía multidimensional en fase gaseosa (ISO 22854:2008, IDT) NTE INEN-ISO 22854; en vigor desde el año 2014.
- La calidad del suelo. La norma NTE INEN-ISO 14507, que se aplica desde 2014, establece un protocolo para el tratamiento de muestras para detectar contaminantes orgánicos.

Los criterios de calidad y remediación para suelos contaminados establecidos en el marco del Acuerdo Ministerial No. 097-A, que forma parte del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente de Ecuador, se describen en la Tabla AM 097, Tabla 2. Esta tabla es indispensable para la gestión ambiental, ya que establece los límites permisibles para una variedad de contaminantes en el suelo para proteger la salud pública y el medio ambiente (MAATE, 2018).

Los niveles aceptables de varios contaminantes en el suelo dependen de los criterios establecidos en esta tabla. Estos son algunos de los parámetros incluidos (MAATE, 2018):

**Tabla 2***Límites permisibles para diversos contaminantes en suelos*

<b>Parámetro</b>	<b>Unidad</b>	<b>Concentración máxima</b>
Hidrocarburos totales (TPH)	mg/L	20
Organoclorados	mg/L	0.05
Organofosforados	mg/L	0.01
Cadmio (Cd)	mg/L	0.05
Níquel (Ni)	mg/L	2
Plomo (Pb)	mg/L	0.2
Arsénico (As)	mg/L	0.1
Mercurio (Hg)	mg/L	0.005

Para evaluar la movilidad y el potencial riesgo ambiental de los contaminantes presentes en el suelo, se realizan ensayos de lixiviación utilizando el método EPA 1311, conocido como TCLP (Toxicity Characteristic Leaching Procedure) (MAATE, 2018).

### **2.2.7 Biorremediación**

La biorremediación es una técnica ambiental que se basa en microorganismos, incluyendo bacterias que metabolizan contaminantes, hongos que descomponen materia orgánica en general y absorben metales pesados, algas que absorben nutrientes y metales y plantas que algunas de sus especies pueden acumular y eliminar ciertos contaminantes

(Benavides et al., 2006). Todos ellos, ya sean microorganismos nativos o introducidos, poseen habilidades metabólicas especiales que les permiten descomponer y neutralizar sustancias tóxicas en su entorno. Así, las sustancias peligrosas se descomponen y transforman en otras menos dañinas lo que facilita su eliminación (Rodríguez, 2003a). La biorremediación permite eliminar los contaminantes de manera eficiente y sostenible en comparación con otros métodos físicos o químicos. Por lo general, es menos costoso que los métodos tradicionales ya que ayuda a restaurar el equilibrio de formas naturales (Garzón et al., 2017).

La biorremediación empieza cuando una enzima llamada dioxigenasa adiciona dos átomos de oxígeno al anillo aromático, constituyendo un cisdihidrodiol. Este proceso reduce la aromaticidad del anillo. Luego, una enzima deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> reconstruye el anillo aromático, creando un catecol, que es un compuesto con dos grupos hidroxilo. Finalmente, enzimas dioxigenasas estereo selectivas rompen el anillo aromático del catecol (Álvarez, 2015).

Es posible clasificar los resultados finales del proceso de biorremediación en tres categorías distintas: (a) Aunque la molécula contaminante se descompone en diferentes moléculas, la molécula original se produce si se unen todas las moléculas. (b) Descomposición de moléculas orgánicas originales en formas minerales, (c) Cambio simple de una molécula en un contaminante cambiando su estructura principal (A. Rodríguez et al., 2022).

#### **2.2.7.1 Restauración biológica del suelo contaminado con petróleo**

La degradación de compuestos de carbono e hidrógeno, también conocidos como hidrocarburos, por parte de los microorganismos es crucial desde el punto de vista tanto económico como ambiental, debido a que los hidrocarburos pueden causar daños

significativos a la salud humana y al medio ambiente cuando se liberan de manera descontrolada (A. Rodríguez et al., 2022).

La capacidad que tienen los microorganismos para descomponer y eliminar dichos compuestos, es uno de los principales mecanismos por el cual se remueve el petróleo y otros hidrocarburos contaminantes de los ecosistemas. Por lo que, este proceso natural de biorremediación juega un papel clave en la descontaminación y restauración de ambientes contaminados por derrames o fugas de hidrocarburos (Rodríguez et al., 2022).

La biodegradación ocurre naturalmente porque los microorganismos transforman y metabolizan aeróbicamente los hidrocarburos y otros compuestos orgánicos hasta, dióxido de carbono, agua y fuentes de alimento para sustentar su crecimiento y reproducción (Rodríguez et al., 2022).

Las características estructurales de cada grupo de hidrocarburos determinan la velocidad y la viabilidad de la degradación del petróleo; la fracción liviana se degrada más rápidamente que la fracción pesada. Por lo general, se mineraliza completamente en carbono y agua. La falta de solubilización del compuesto y su lenta liberación desde los poros del suelo suelen ser los obstáculos para que esto ocurra con las fracciones más pesadas (Rodríguez, 2003b).

En 1992, Yong y Col. descubrieron cómo se degradan los hidrocarburos del petróleo en diferentes órdenes. Los hidrocarburos alifáticos de cadena lineal se degradan primero, seguidos por los alifáticos de cadena ramificada, luego los compuestos monoaromáticos (como xileno, etilbenceno, benceno y tolueno), luego los compuestos con dos o más anillos y finalmente los compuestos poliaromáticos.

La biorremediación de suelos contaminados con petróleo puede lograrse mediante dos métodos diferentes: anaerobio o aerobio. Sin embargo, la mayoría de los procesos de remediación se llevan a cabo mediante degradación aerobia. Es importante destacar que no todos los hidrocarburos se degradan de la misma manera debido a la diferencia de moléculas de los hidrocarburos. Por lo tanto, cada proceso de biorremediación requiere varios procedimientos (Benavides et al., 2006).

### **2.2.8 Géneros bacterianos utilizados en la biorremediación de hidrocarburos**

La presencia de petróleo y otros derivados en el suelo, favorece a ciertas comunidades microbianas que pueden adaptarse y utilizar este nuevo sustrato, creando una situación selectiva. Las bacterias que tienen la capacidad fisiológica y metabólica de degradar el petróleo se conocen como hidrocarburoclásticos. Los microorganismos que degradan hidrocarburos representan menos del 0.1% de la comunidad microbiana en ecosistemas no contaminados, pero su proporción puede ser mucho mayor en ecosistemas contaminados con hidrocarburos. Las características nutricionales asociadas con el contaminante y a la resistencia a diversos tipos de estrés ambiental son características predominantes en estas comunidades (Álvarez, 2015).

Los microorganismos que comúnmente se hallan en el suelo son las arqueas metanógenas e hipertermófilas son un grupo de microorganismos procariotas que, aunque se parecen a las bacterias en tamaño y forma, difieren significativamente en términos bioquímicos y genéticos. Dos grupos principales se encuentran en este dominio: las Euryarchaeota, que presentan metanógenos, termoacidófilos e hiperhalófilos, y las Crenarchaeota, que presentan hipertermófilos, acidófilos, reductores y/u oxidantes del azufre y quimiolitoheterótrofos (Vizúete et al., 2020).

Las arqueas metanógenas se utilizan en el tratamiento de aguas residuales para producir biogás mediante la digestión anaeróbica. Además, se cree que las condiciones termorreductoras de las fuentes hidrotermales hicieron que los primeros organismos en la tierra fueran hipertermófilos (Vizúete et al., 2020).

Las bacterias gram positivas como *Arthrobacter*, *Nocardia* (Nocardioformes) y *Streptomyces* (Actinomicetos), son una parte importante de la comunidad microbiana del suelo. Estas bacterias descomponen hidrocarburos, materiales vegetales viejos y humus (Vizúete et al., 2020).

Por otro lado, *Pseudomonas* y otras bacterias gram negativas prosperan en presencia de nutrientes abundantes. Por lo tanto, el género *Pseudomonas* tienen la habilidad de producir surfactantes, compuestos químicos anfipáticos que pueden reducir la tensión superficial de una sustancia. Para que las bacterias tengan este potencial de biorremediación, es necesario conocer factores como la fisiología de las bacterias, el entorno ambiental que contiene el contaminante y la composición de las moléculas de petróleo (Mayz & Manzi, 2017).

Los biosurfactantes, producidos por las propias bacterias durante los procesos de biorremediación, ayudan a mejorar la biodisponibilidad de sustancias hidrófobas de dos maneras. Aumentando la rapidez con la que algunas moléculas de hidrocarburo pueden diluirse mediante su separación por micelas, e influyendo en la disolución, que puede causar el surfactante al entrar en contacto con la superficie del compuesto (Mayz & Manzi, 2017).

Como resultado, ciertos microorganismos poseen y recurren a esta propiedad porque mejora la biodisponibilidad del sustrato a utilizar, lo que beneficia el proceso de biorremediación. El crecimiento de microorganismos aumenta con la biodisponibilidad de un contaminante, lo que aumenta la probabilidad de biorremediación (Mayz & Manzi, 2017).

Se descubrió en un estudio con *Pseudomonas* que consumía primero los alcanos entre C5 y C16. Además, se ha descubierto que, con más carbonos en una cadena lineal, el compuesto se vuelve más hidrofóbico, lo que hace que los alcanos de cadenas largas (>C40) se degraden más rápidamente, tal y como se observó. En estudios realizados en humedales del Golfo de México que fueron afectados por un derrame, se descubrió que los contaminantes monoaromáticos se degradan por varias vías metabólicas diferentes, dependiendo de la estructura molecular de la sustancia (Das & Chandran, 2011).

El tolueno es el hidrocarburo más consumido en condiciones aerobias, entre el benceno, el tolueno y los xilenos. Sin embargo, según las bacterias presentes en las áreas contaminadas, estas moléculas pueden seguir diferentes rutas metabólicas. Se han observado degradaciones de xilenos en presencia de *Pseudomonas* sp. También se observa que, durante la degradación de los HAPs, la tasa de consumo disminuye a medida que aumentan los anillos policíclicos aromáticos y la hidrofobicidad aumenta y los microorganismos no pueden acceder a ellos. El proceso comienza con la oxidación de la molécula hidrocarbúrfica para formar dihidrodioles, que luego sirven como intermediarios dihidroxilados orto o meta para formar catecol, que luego entra en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (McGenity et al., 2012).

#### **2.2.8.1 *Pseudomonas koreensis***

*Pseudomonas koreensis* es una bacteria gram negativa, aerobia perteneciente al género *Pseudomonas* sp. Es un bacilo recto o ligeramente curvado y su movilidad proviene de sus flagelos polares. Tiene la capacidad de colonizar una amplia variedad de áreas ecológicas y se puede aislar e identificar en diferentes lugares. Su nombre proviene debido a que fue identificada por primera vez en 2003 a partir de muestras de suelos agrícolas en

Corea del Sur. Debido a sus características distintivas y a su potencial para aplicaciones biotecnológicas y agrícolas, ha sido objeto de interés científico desde entonces (Kwon et al., 2003).

### **Características morfológicas**

Es una bacteria gram negativa que no forma esporas y tiene células en forma de bastón de 1-2  $\mu\text{m}$ . Varios flagelos polares la hacen móvil. En el agar Luria-Bertani (LB), forma colonias circulares de color blanco-amarillo y se vuelven mucoides después de dos días en el agar de soya tripticaseína (TSA). Producen un pigmento fluorescente en medios King B y PAF (Kwon et al., 2003).

### **Propiedades bioquímicas y fisiológicas**

Tanto la catalasa como la oxidasa son positivas. Aunque hidroliza arginina y Tween 80, la mayoría de las cepas no hidrolizan almidón ni muestran acidificación de glucosa. Tiene una reacción de lecitinasa mayormente positiva y no reduce los nitratos a nitritos. Crece a temperatura de 4 °C, pero no a 37 °C, y puede tolerar concentraciones de cloruro de sodio del 5%, pero no más del 7%. La producción de indol del triptófano es negativa (Babu et al., 2015).

### **Genética y Relaciones filogenéticas**

La cepa Ps 9-14T corresponde a *Pseudomonas koreensis*. El contenido de G+C (guanina + citosina) del ADN es de 60,7 mol%. Una alta similitud (99,5%) con *Pseudomonas pavonaceae* y *Pseudomonas jessenii* se muestra a través de análisis de secuencias de 16S rDNA (Babu et al., 2015).

### **Utilización de sustratos**



Usa ácidos orgánicos como el ácido cítrico y el ácido málico, así como azúcares como la D-glucosa y la D-fructosa (Kwon et al., 2003).

### **Capacidad Metabólica**

El género *Pseudomonas* es conocido por su versatilidad metabólica, lo que le permite explotar una variedad de nutrientes y adaptarse a una amplia gama de condiciones ambientales. *P. koreensis* también puede degradar compuestos orgánicos resistentes (Kwon et al., 2003).

Se destaca por su capacidad para degradar una amplia gama de compuestos orgánicos complejos. utilizando una variedad de hidrocarburos alifáticos y aromáticos para producir carbono y energía (Kwon et al., 2003).

La capacidad para producir enzimas oxidativas como oxidasas y peroxidasas es una característica que facilita la degradación de hidrocarburos. Estas enzimas son esenciales para romper los enlaces químicos de las estructuras de los hidrocarburos, lo que permite su transformación en productos menos tóxicos y más fácilmente asimilables por la bacteria (Kwon et al., 2003).

### **Producción de Biosurfactantes**

*P. koreensis* puede producir biosurfactantes, que pueden aumentar la biodisponibilidad de los contaminantes hidrofóbicos y hacer que la bacteria los pueda acceder y destruir. Se ha observado que la cría de *P. koreensis* en sustratos baratos como el glicerol produce estos biosurfactantes (Kwon et al., 2003).

### **Adaptabilidad Ambiental**

Esta especie es ideal para la biorremediación en áreas altamente contaminadas porque puede sobrevivir en suelos con alta concentración de contaminantes y baja disponibilidad de nutrientes (Kwon et al., 2003).

### **2.2.8.2 Mecanismos de Acción de *Pseudomonas koreensis* en la Biorremediación**

Varios mecanismos clave determinan la capacidad de *Pseudomonas koreensis* para degradar hidrocarburos en suelos contaminados:

**Degradación Enzimática:** *P. koreensis* produce varias enzimas que ayudan a descomponer los hidrocarburos en compuestos menos complejos y menos dañinos. Las oxigenasas y deshidrogenasas son enzimas que rompen los enlaces carbono-hidrógeno y agregan oxígeno a la molécula de hidrocarburo, lo que inicia la degradación (Antona, 2015).

**Tolerancia a metales pesados:** la presencia de metales pesados en muchos lugares contaminados puede inhibir la actividad microbiana. *Pseudomonas koreensis* es resistente a estos metales, lo que le permite realizar biorremediación en condiciones donde otras bacterias podrían no sobrevivir (Mayz & Manzi, 2017).

**Emulsificación y Movilización:** *P. koreensis* produce biosurfactantes que mejoran la biodisponibilidad de los hidrocarburos y facilitan su movilización en el suelo, lo que permite a la bacteria acceder más fácilmente a los contaminantes (Mayz & Manzi, 2017).

## **CAPÍTULO III: Diseño Metodológico**

### **3.1 Tipo y diseño de investigación**

El presente trabajo de investigación es un estudio experimental con un diseño completamente al azar, el cual determinara la eficiencia en la biorremediación de suelos contaminados con diésel.

### **3.2 La población y la muestra**

#### **3.3.1 Población**

Estuvo constituida por la población microbiana de páramo andino, obtenida a partir de las muestras tomadas en los diferentes pisos altitudinales del Parque Nacional Cajas.

#### **3.2.2 Muestra**

Conformada por la especie bacteriana *Pseudomonas koreensis*.

### **3.3 Los métodos y las técnicas**

#### **3.3.1 Identificación microbiana de la rizosfera de páramo andino para la obtención de la especie *Pseudomona koreensis***

##### **3.3.1.1 Obtención de muestras**

Se llevó a cabo un muestreo aleatorio utilizando una distribución de gradiente sistemática, para asegurar una selección imparcial y uniforme. El muestreo se estratificó por piso altitudinal, recolectándose 5 muestras en cada uno, las muestras fueron tomadas en el parque Nacional Cajas, en la provincia de Azuay. Los puntos de recolección de muestras se establecieron a través de tres gradientes de altitud del páramo andino (4 000, 3 750, 3 500 m s.n.m). Estos puntos fueron referenciados geográficamente utilizando las coordenadas

obtenidas a través del Sistema de Posicionamiento Global (Tabla 2). Dicha metodología se fundamenta en los hallazgos de un estudio previo llevado a cabo por Idrobo (2024).

Las muestras se recolectaron a 10 cm de profundidad, se almacenaron en bolsas de plástico y se transportaron al laboratorio CITLAB al área de microbiología, dentro de las 24 horas para su análisis microbiológico.

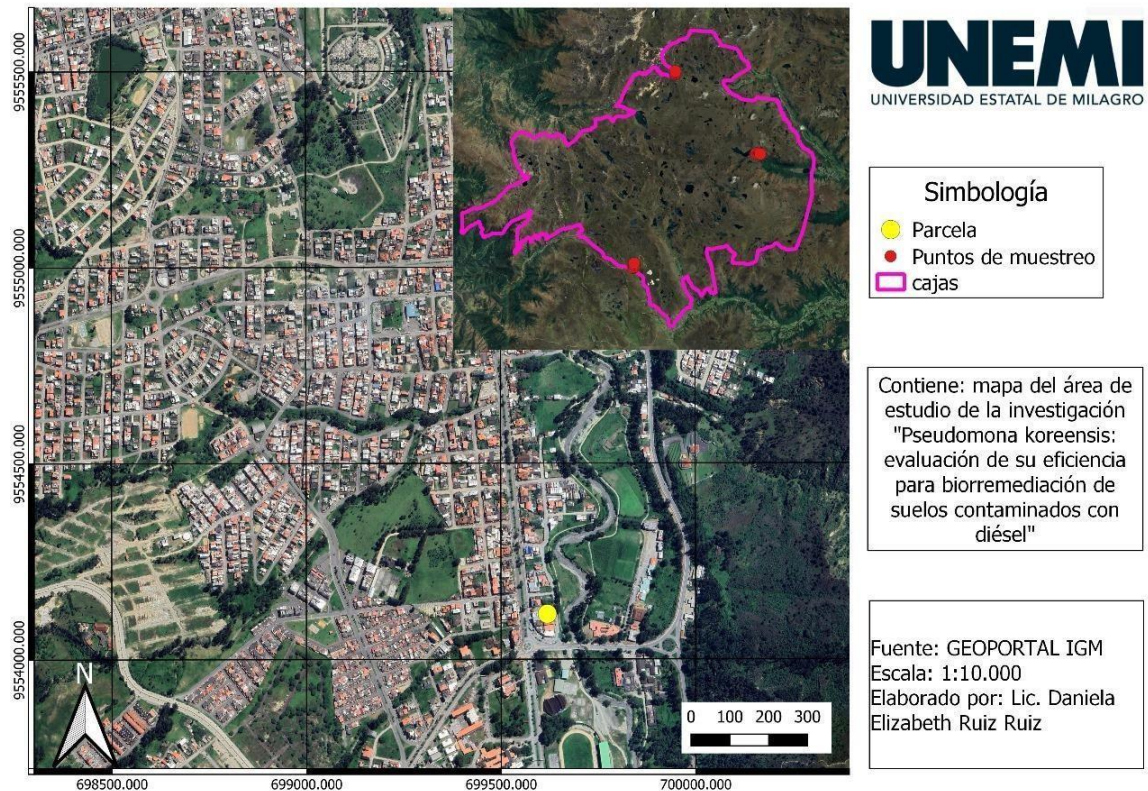
**Tabla 3**

*Ubicación geográfica de los sitios de muestreo*

Punto	WGS 84 zona 17S		Altitud m s.n.m
	X	Y	
<b>P1</b>	695938,20	9693169,84	4 071
<b>P2</b>	695850,08	9692912,20	4 080
<b>P3</b>	696216,79	9692659,52	4 079
<b>P4</b>	696780,12	9692500,36	4 000
<b>P5</b>	696913,56	9692487,64	3 965
<b>P6</b>	700054,60	9691783,36	3 749
<b>P7</b>	699967,11	9691823,37	3 750
<b>P8</b>	699808,10	9691992,49	3 738
<b>P9</b>	699711,29	9691818,20	3 781
<b>P10</b>	699986,09	9691742,18	3 768
<b>P11</b>	702582,54	9692613,82	3 531
<b>P12</b>	703451,14	9692480,37	3 465
<b>P13</b>	702817,97	9692643,10	3 515
<b>P14</b>	702673,59	9692620,55	3 526
<b>P15</b>	702714,41	9692737,01	3 510

**Figura 1**

*Área de estudio*



### 3.3.2 Caracterización de los microorganismos del suelo rizosférico

#### 3.1.2.1 Acondicionamiento preliminar

El procesamiento de las muestras consto de la eliminación de las impurezas, procediendo a realizar la suspensión de las muestras de suelo rizosférico, pesando 1 g de cada muestra y diluyéndola en 9 ml de agua destilada.

Las muestras se homogeneizaron mediante agitación en un Vórtex durante 1 minuto a 1 500 rpm. Este proceso se llevó a cabo para las 5 muestras de cada piso altitudinal.

#### 3.3.2.2 Técnicas de aislamiento y purificación

Para el aislamiento de la microbiota de la rizosfera, implicó realizar diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$ , de las cuales se escogió la dilución cuarta y quinta, para proceder al sembrado de 100  $\mu$ l en placas de agar nutriente, incubadas a 28 °C durante 48 horas.

Para purificar las cepas, se realizaron resiembras repetidas en medios de cultivo específicos, como agar nutriente para bacterias y agar papa dextrosa para hongos, hasta obtener cultivos puros de cada microorganismo.

### **3.3.2.3 Identificación y caracterización de la microbiota de la rizosfera con el objetivo de aislar la especie *Pseudomona koreensis***

Con base en las características fenotípicas, la identificación se realizó mediante los siguientes procedimientos de laboratorio.

**Caracterización macroscópica:** En este estudio se utilizó el método de identificación según (Jawetz et al., 2011), el cual se realizó tomando en cuenta la elevación, color, forma y textura de las colonias, formadas en la superficie del medio de cultivo.

**Caracterización microscópica:** Un método útil y rápido para diferenciar entre dos tipos de bacterias (bacterias Gram positivas y Gram negativas) es la tinción de Gram (Jawetz et al., 2011). Primeramente, para trabajar en un ambiente estéril, se procedió a limpiar con alcohol al 70% y se esterilizo los instrumentos a utilizar. Se procedió a realizar el frotis bacteriano, diluyendo la colonia con solución salina, para posteriormente calentarla para fijarla al portaobjetos, luego se procedió a teñir con Cristal Violeta durante un minuto, se enjuaga y se colocó Lugol durante un minuto, se vuelve a enjuagar y se procede a decolorar con Alcohol cetona, eliminando el exceso para colocar Safranina durante un minuto y lavar.

Seguidamente se observó en un microscopio óptico con aumento de 100x, observando su estructura, agrupación y color.

#### **3.3.2.4 Identificación preliminar de *Pseudomonas***

Una vez realizada la tinción, se procedió a observar las características morfológicas representativas de la especie *Pseudomona koreensis*, incluyendo su forma, color y tamaño. Adicionalmente, se llevaron a cabo las siguientes pruebas bioquímicas como son la catalasa y la oxidasa.

Tras un análisis inicial, se observó que las características observadas corresponden a la especie *Pseudomonas*. Con el objetivo de obtener aislamiento de cepas puras, sin contaminación de otras especies bacterianas, se realizaron nuevas siembras en medios de cultivo agar nutriente, agar sangre y agar MacConkey. Este proceso permitió aislar cepas individuales de *Pseudomonas*, libres de cualquier contaminante, para su posterior caracterización y estudio.

#### **3.3.2.5 Identificación fenotípica automática basada en el análisis del perfil de proteínas ribosomales utilizando la técnica de Espectrometría de Masas por Ionización con Láser Asistida por Matriz y Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF)**

Para el proceso de Identificación con MALDI-TOF primero se procedió a la preparación de las muestras, en la cual se tomó una pequeña cantidad de una colonia bacteriana pura aislada del medio de cultivo, para depositarla en el pocillo de la placa del espectrómetro de masas, seguidamente para la ionización y vaporización, se añadió una solución matriz sobre la muestra en el pocillo y se introduce la placa en el espectrómetro, dando lugar a que las proteínas de la muestra, principalmente proteínas ribosomales, son

ionizadas mediante un pulso de láser, generando iones los cuales son acelerados en un campo eléctrico y viajan a través de un tubo de vuelo al detector y son separados en función de su relación masa/carga (m/z). Finalmente, El espectrómetro de masas registra la abundancia relativa de los diferentes iones presentes en la muestra, generando un espectro de masas característico, el cual se compara automáticamente con una extensa base de datos de espectros de referencia de microorganismos.

El sistema MALDI-TOF analizó la coincidencia entre los espectros de las muestras y los espectros de referencia en la base de datos, por lo que obtuvo la especie de *Pseudomonas koreensis*.

La metodología descrita en el presente estudio fue desarrollada y aplicada en el laboratorio de microbiología aplicada MEDICULT (Anexo A).

### **3.3.2.6 Preservación de la cepa**

Para el método de conservación de la cepa *Pseudomonas koreensis* se procedió a utilizar crioperlas, las cuales son perlas de cerámica que se impregnan con la solución celular a congelar. La cuales estuvieron conservadas a -20 °C.

### **3.3.3 Evaluar el potencial de *Pseudomonas koreensis* como agente biorremediador en suelos impactados por derrames de combustible diésel**

#### **3.3.3.1 Activación y preparación de la cepa**

Para obtener una mayor población de *Pseudomonas koreensis* y un bajo costo de implementación, se activó la cepa en base a la metodología propuesta por (Loroña et al., 2019), para lo cual, se colocó en 1,5 litros de melaza, 1,5 litros de la cepa bacteriana y 27 litros de agua. Seguidamente, la mezcla se la colocó en un contenedor hermético y se la dejó



fermentar a temperatura ambiente, monitoreando diariamente el pH de la mezcla hasta que su valor sea inferior a cuatro, determinando crecimiento bacteriano (Tecnología EM<sup>TM</sup>, 2019).

### **3.3.3.2 Montaje del ensayo**

El montaje del ensayo se lo desarrolló en un predio privado, para lo cual se estableció una parcela de 9 x 7,5 m, siguiendo un diseño experimental completamente aleatorio (DCA), aplicando 2 tratamientos, el Testigo (T) y el tratamiento con *Pseudomonas koreensis* (Pk), realizando 6 repeticiones para cada tratamiento. Se colocaron 12 unidades experimentales en recipientes plásticos de 28.9 x 28.9 cm de diámetro, por 13 cm de profundidad, perforados en su base. Cada unidad experimental fue llenada con tierra sin cobertura vegetal y colocadas con una separación de 1 m de distancia entre sí, y 2 m de distancia del margen de la parcela para evitar efecto borde.

El volumen de vertido de contaminante en cada unidad experimental fue de 180 ml, el cual con ayuda de una pala de mano se homogenizó y se dejó reposar 24 horas para asegurarse se impregne previo el análisis de TPH y metales pesados. Pasado este tiempo, a las unidades experimentales con el tratamiento *Pseudomonas koreensis*, se les colocó 0.5 lb de aserrín y se homogenizó con ayuda de una pala de mano (Bustamante & Silva, 2019). Seguidamente, se adicionó 48 ml de solución bacteriana y se repitió esta aplicación cada tres días durante un lapso de 18 días, utilizando la metodología de aplicación y aspersion de Loroña et al., (2019), realizando volteos cada tres días para mejorar la aireación del suelo a tratar.

### **3.3.3.4 Variables medidas**

Para medir la eficiencia de biorremediación de la cepa de estudio, se la realizó en base a los resultados de los análisis de hidrocarburos totales del petróleo (TPH), del metal pesado Plomo (Pb), para lo cual se utilizará la fórmula propuesta por (Jimenez, 2020).

$$Eficiencia (\%) = \frac{Concentración\ inicial - Concentración\ final}{Concentración\ inicial} \times 100$$

Para la medición in situ se la realizó en base al potencial hidrógeno, medido diariamente en cada unidad experimental. De igual manera, para el análisis de TPH se envió una muestra compuesta de suelo para cada tratamiento (conformada de 100 gr por cada unidad experimental) y se los envió a analizar al Centro de Soluciones Analíticas Integrales CENTROCESAL CIA.LTDA a través del POE 7.2.58 Método EPA 8015B, no halogenado usando cromatografía de gases con detección por ionización de llama (GC-FID) modificado.

Para el metal pesado se envió una muestra compuesta de cada tratamiento (conformada de 100 gr por cada unidad experimental) y se la envió al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias para su análisis a través del método de Espectrómetro de absorción atómica acoplado a horno de grafito.

Se realizaron tres análisis para cada variable (TPH y metal pesado), una al iniciar la investigación y otra al finalizar la misma con el testigo.

### **2.3 Variables externas**

Con ayuda de datos obtenidos de la estación meteorológica de la Universidad Técnica Particular de Loja, se realizaron mediciones diarias de los factores climáticos (temperatura,

precipitación y humedad), que permitan determinar las condiciones bajo las que fue sometida la investigación, debido a que en el montaje de nuestras unidades experimentales no se controlaron ningún tipo de variables.

### **3.4 Procesamiento estadístico de la información**

Con ayuda del Sistema de Análisis Estadístico SPSS, se realizó el modelo estadístico para saber si la distribución de los datos es paramétrica o no paramétrica, se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, en la cual se observó que los resultados no tienen una distribución normal, para lo cual se procedió a realizar la prueba de Mann-Whitney.

## **CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados**

### **4.1. Análisis e Interpretación de Resultados**

#### **4.1.1 Resultado del aislamiento e identificación de la bacteria *Pseudomonas koreensis*, procedente de páramo andino del Parque Nacional Cajas**

Mediante las muestras de la rizosfera del suelo procesadas, se identificó la presencia de la bacteria *Pseudomonas Koreensis*, a través de caracterización fenotípica macroscópica y microscópica, además de emplear técnicas avanzadas como la espectrometría de masas MALDI-TOF. En la tabla 4 se detalla de mejor manera el procesamiento de resultados.

**Tabla 4**

*Resultados del proceso de aislamiento e identificación*

Aislamiento		Validación de las muestras			Microorganismo Identificado	
Obtención Muestra	Cultivo		Caracterización fenotípica automática			
Parque Nacional Cajas	Caracterización fenotípica		Identificación Macroscópica	Identificación Microscópica	Pruebas Bioquímicas	Espectrometría de masas MALDI-TOF (Anexo B)
	Agar	Morfología	Tinción Gram	de Catalasa	Oxidasa	Género Especie
	Agar MacConkey	Colonias de color blanco amarillento, brillantes, borde continuo u ondulado con centro opaco.	Bacilo negativo	Gram +		<i>Pseudomonas Koreensis</i> (Anexo C)

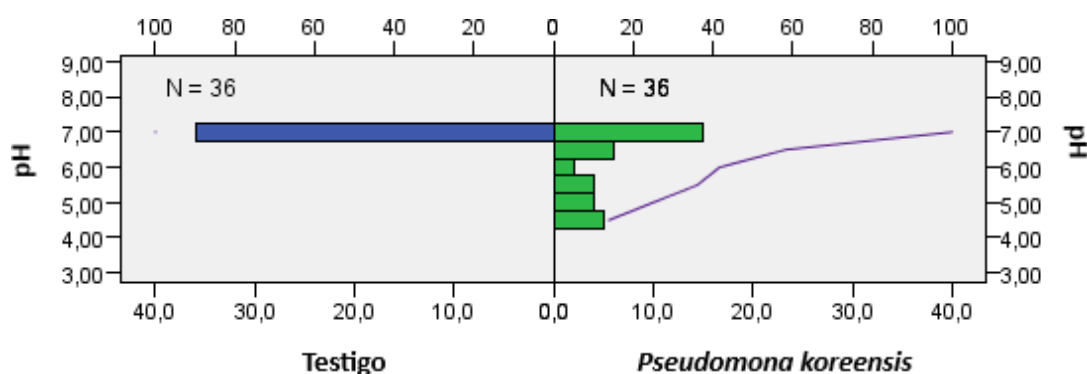
#### 4.1.2 Resultado del ensayo in situ que permite determinar la eficiencia de la especie *Pseudomonas koreensis* en la biorremediación de suelo contaminado con diésel

##### 4.1.2.1 Medición de pH in situ

En la figura 2, se detallan las mediciones del pH con su valor alcanzado, obteniendo que todas las unidades experimentales del Testigo (T2) no variaron a lo largo del periodo de estudio. Mientras tanto, el tratamiento con la bacteria *Pseudomonas koreensis* (T1), presentó variaciones a lo largo de 18 días del periodo de estudio, con resultados de pH que oscilan con un mínimo de 4,5 y un máximo de 7,1.

**Figura 2**

*Mediciones de pH*



Para saber si la distribución de los datos es paramétrica o no paramétrica, se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (Tabla 5), en donde su p-valor fue de 0,000, siendo menor al grado de significancia (0,05), permitiendo determinar que no existe normalidad en los datos, presentando una variación en la normalidad de los resultados.

**Tabla 5***Prueba de normalidad*

	Shapiro-Wilk	
	gl	Sig.
Medición de pH con frecuencia cada 3 días	72	,00000

Por su parte, el p-valor de la prueba de Mann-Whitney (Tabla 6), es menor al grado de significancia (0,05), concluyendo que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el pH y tipo de tratamiento, deduciendo que el tratamiento empleado tiene un considerable efecto sobre los resultados obtenidos.

**Tabla 6***Prueba de Mann-Whitney*

Prueba	pH
U de Mann-Whitney	198,000
W de Wilcoxon	864,000
Z	-5,830
Significancia	,000

#### 4.1.3 Análisis de hidrocarburos totales de petróleo (TPH)

El análisis de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) (Anexo D), evidenció que el tratamiento con la especie *Pseudomonas koreensis*, tuvo una eficiencia de 52,856 %, siendo

un valor óptimo en comparación al testigo, en donde su eficiencia fue de 34, 136 % en relación al suelo sin ningún tipo de tratamiento.

### Tabla 7

*Resultados de eficiencia para cada uno de los tratamientos*

---

#### Fórmula para determinar la eficiencia de los tratamientos

---

$$Eficiencia (\%) = \frac{Concentración\ inicial - Concentración\ final}{Concentración\ inicial} \times 100$$

---

$$Eficiencia\ T1 (\%) = \frac{1453 - 685}{1453} \times 100 \qquad Eficiencia\ T2 (\%) = \frac{1453 - 957}{1453} \times 100$$

$$Eficiencia\ T1 (\%) = 52,856$$

$$Eficiencia\ T2 (\%) = 34,136$$

---

*Nota. Tratamiento con Pseudomonas korensis (T1), Testigo (T2).*

#### 4.1.4 Análisis de Plomo

A través del análisis de Plomo realizado para cada uno de los tratamientos mediante espectrómetro de absorción atómica acoplado a horno de grafito en el Instituto de investigaciones agropecuarias (INIAP)(Anexo E) , se obtuvieron resultados similares para cada uno de los tratamientos, con mínima diferencia en relación al suelo contaminado previa aplicación de los tratamientos, denotando que no existió una disminución evidente en el tratamiento de *Pseudomonas korensis* (T1) para descomponer plomo del suelo. Los resultados reflejaron que el suelo contaminado con diésel y tratado con *Pseudomonas korensis* presentó un resultado de 24.4 mg kg<sup>-1</sup>, en relación al resultado sin tratamiento (ST)



de 28.9 mg kg<sup>-1</sup>, y el testigo de 24.6 mg kg<sup>-1</sup>, obteniendo una eficiencia de 18.442% para (T1) y de 17.479% para (T2).

**Tabla 8**

*Análisis de Plomo para los tratamientos efectuados*

Tratamiento	Resultado de Plomo (Pb) mg kg <sup>-1</sup>
ST	28.9
T1	24.4
T2	24.6

*Nota. Sin tratamiento (ST), Tratamiento con Pseudomonas koreensis (T1), Testigo (T2).*

**Tabla 9**

*Resultados de eficiencia para cada uno de los tratamientos*

Fórmula para determinar la eficiencia de los tratamientos

$$Eficiencia (\%) = \frac{Concentración\ inicial - Concentración\ final}{Concentración\ inicial} \times 100$$

$$Eficiencia\ T1 (\%) = \frac{28.9 - 24.4}{24.4} \times 100 \quad Eficiencia\ T2 (\%) = \frac{28.9 - 24.6}{24.6} \times 100$$

$$Eficiencia\ T1 (\%) = 18.442$$

$$Eficiencia\ T2 (\%) = 17.479$$



#### 4.1.5 Resultados del promedio obtenido de las variables externas

En la tabla 10 se detalla el promedio obtenido de las variables externas durante el tiempo del ensayo in situ, recalcando que en este estudio no se controlaron las variables externas, obtenidas de la estación científica de la Universidad Técnica Particular de Loja, dándonos los siguientes resultados:

**Tabla 10**

*Variables climáticas externas*

<b>Variable</b>	<b>Valor promedio</b>
Temperatura	22°C
Humedad	77.2 %
Precipitación	41 mm

## CAPÍTULO V: Conclusiones, Discusión y Recomendaciones

### 5.1. Discusión

Las zonas montañosas de los andes del Ecuador, son conocidos por su alto nivel de biodiversidad y endemismo, donde el 86% de las especies de plantas son endémicas de estos ecosistemas (Aguirre, 2017). No obstante, existe una carencia de investigaciones de la riqueza de microorganismos rizosféricos de estos ecosistemas y su potencial biotecnológico Idrobo, (2024). Por su parte, Jimenez, (2020) y Vizuite et al., (2020) afirma que los microorganismos nativos tienen la capacidad de adaptarse y remediar contaminantes en el suelo, lo que permitió que esta investigación se centre en probar la eficiencia de una bacteria nativa aislada a partir de suelo rizosférico de páramo andino.

Lin et al. (2016) en el país de China, aisló la cepa *Pseudomonas koreensis* de la rizosfera de arroz, la cual es proveniente mismo de Asia Oriental. Sin embargo, en base a la investigación realizada por Idrobo, (2024) en Ecuador, registró el aislamiento y la identificación de la especie *Pseudomonas Koreensis* existente en estado natural de paramo andino ecuatoriano, aislada de suelo rizosférico a diferentes pisos altitudinales del Parque Nacional Cajas. Esta investigación, se corrobora con nuestros resultados obtenidos, ya que nos permitió aislar e identificar la especie *P. Koreensis* recolectada en el mismo rango altitudinal.

El género *Pseudomonas* es ampliamente utilizado en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos Alvarez, (2015). Debido a su amplia diversidad metabólica, *Pseudomonas* se utiliza en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos ya que utiliza una variedad de compuestos como fuentes de carbono y energía, incluida la capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos y alifáticos, convirtiéndolos en

productos menos tóxicos o mineralizándolos completamente a CO<sub>2</sub> y agua (Conde et al., 2021). Por estas razones se decidió el aislamiento, caracterización y uso de dicha bacteria para llevar a cabo la presente investigación.

Inclusive, en el estudio realizado por Pérez (2018), dicha bacteria se adapta y sobrevive a condiciones ambientales desafiantes, como las altas concentraciones de sal y a las fluctuaciones en la temperatura y el pH. Lo que se destaca en esta investigación ya que *P. Koreensis* para su activación y posterior uso se procedió a dejar fermentar a una temperatura entre 19°C Y 25°C, y el monitoreo del pH hasta alcanzar un valor de seis. Del mismo modo, Loroña (2019) afirmó que en su investigación para obtener una eficiencia de sus microorganismos para la biorremediación opto por la activación de los mismos hasta alcanzar el pH óptimo.

Al igual que otros hidrocarburos, el diésel tiene la capacidad de provocar alteraciones en las características físicas y químicas del suelo, incluyendo su pH, por esta razón se han realizado investigaciones como la de Morales et al. (2019) en la cual reveló que el pH del suelo estudiado, no mostró cambio significativo con la presencia de diésel, manteniéndose inalterable incluso tras un año de un derrame de diésel, de igual manera la investigación realizada por Martínez (2001), demostró que el pH del terreno no mostró cambios notables al ser contaminado con diésel. Dichas investigaciones concuerdan con nuestros resultados obtenidos, ya que el pH del suelo no cambio significativamente tras la contaminación con diésel manteniéndose en un pH 7.0.

Según las investigaciones realizadas la estabilidad del pH en suelos contaminados se puede atribuir a varios factores relacionados con la química del suelo y las propiedades del diésel, por ejemplo Petenello & Beltrán (2014) menciona que debido a la composición

química del diésel, debido a que es una mezcla de hidrocarburos que en concentraciones típicas no tiene un efecto ácido o básico significativo en el suelo. Esto significa que su adición no altera drásticamente el equilibrio de iones que determina el pH.

Además, los suelos tienen una capacidad natural para resistir cambios en el pH, conocida como capacidad de amortiguamiento. Incluso, Martínez (2001) menciona que los hidrocarburos pueden interactuar con la materia orgánica y los minerales del suelo, estabilizando las propiedades químicas sin afectar significativamente el pH. Por otra parte, cabe recalcar que en nuestra investigación la adición de diésel fue en concentraciones bajas, coincidiendo con Martínez (2001), Petenello (2014) y Morales (2019), los cuales en sus estudios las concentraciones de diésel fueron relativamente bajas (por debajo de los límites normativos), lo que probablemente limitó su impacto en las propiedades químicas del suelo, incluido el pH.

Las investigaciones realizadas por Barrios et al., (2022) y Mayz & Manzi (2017), demuestran que algunas cepas de *Pseudomonas*, logran tasas de remoción de hidrocarburos de hasta un 98%, así como la investigación realizada por Wayens (2004) en la cual *Pseudomonas putida*, demostró variaciones significativas en su capacidad para degradar hidrocarburos, dependiendo del tipo específico de hidrocarburo y las condiciones experimentales.

Por ejemplo, en un estudio se reportó que esta bacteria logró una degradación del 100% de ciertos hidrocarburos aromáticos policíclicos como el naftaleno y el antraceno, y un 78.57% de degradación del fenantreno (Samame, 2020), corcondando con nuestra investigación con respecto a que el género *Pseudomonas* se presenta como un potencial significativo para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos ya que se han

obtenido resultados que muestran una eficiencia del 52.856% en la degradación de diésel, recalcando que no se controlaron las condiciones ambientales.

Por otro lado, se observó que *Pseudomonas* logró un 26% de remoción de hidrocarburos en comparación con un consorcio microbiano que alcanzó el 53% (Samame, 2020), estos resultados indican que la eficiencia de *Pseudomonas* puede ser alta en condiciones específicas, pero también puede ser inferior en comparación con otros microorganismos en diferentes entornos. Tal como el estudio realizado por Zhou et al. (2022) en el cual utilizó el género *Sphingomonas spp.* demostrando la degradación de compuestos complejos como los hidrocarburos y los contaminantes orgánicos, logrando degradar hasta un 95% condiciones específicas. Inclusive la investigación “*Mycobacterium* species in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons” obtuvieron que cepas de *Mycobacterium* mostraron una capacidad para degradar HAP de hasta un 95% (Deng et al., 2023).

Se ha comprobado que el género *Pseudomonas* tiene la capacidad de descomponer hidrocarburos, como el diésel, pero no exhibe la misma eficiencia en la descomposición de metales pesados como en este caso el plomo. Esta discrepancia puede ser justificada por diversos factores biológicos y químicos (Avalos & Padilla, 2015). Tal como la investigación realizada por Mayz y Manzi (2017), en la cual *Pseudomonas aeruginosa* demostró ser altamente eficaz en la degradación de hidrocarburos, pero no descompuso ni degradó metales pesados. En concordancia con nuestro estudio, ya que no existió una disminución evidente, ni significativa en el tratamiento con *Pseudomonas koreensis* para descomponer plomo del suelo.

Asimismo, la investigación de Paredes et al. (2021), evidencio que, aunque *Pseudomonas aeruginosa* puede tolerar el plomo, su capacidad para removerlo no es tan eficiente como la que exhibe frente a los hidrocarburos. Debido a que, los mecanismos por los cuales estas bacterias manejan la presencia de metales pesados incluyen biotransformación, precipitación intracelular y unión a estructuras celulares. Estos mecanismos permiten que las bacterias sobrevivan en ambientes contaminados, aunque no necesariamente transformen o eliminen los metales pesados de manera efectiva (Paredes et al., 2021).

## 5.2 Conclusiones

La especie *Pseudomona koreensis* fue identificada a partir de muestras rizosféricas de páramo andino del Parque Nacional Cajas. La técnica de espectrofotometría de masas (MALDI-TOF) es una técnica que brindó resultados de manera precisa en cortos periodos de análisis a un bajo costo de aplicación.

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el pH y el tipo de tratamiento, lo que indica que el tratamiento aplicado tiene un efecto considerable sobre los resultados obtenidos

Los resultados obtenidos en la biorremediación de suelo contaminado con diésel, con un 52.586 % de eficiencia, demostró la eficiencia que esta cepa obtuvo en un corto periodo de tiempo a un bajo costo de aplicación, demostrando el potencial biotecnológico que presenta para ser replicada en futuros procesos de biorremediación.

A pesar de la aplicaron del tratamiento con *Pseudomonas koreensis*, no se observó una disminución significativa en la concentración de plomo en el suelo contaminado de diésel, con una eficiencia de 18.442%.



### 5.3 Recomendaciones

- Se recomienda seguir realizando investigaciones sobre la capacidad de *Pseudomonas koreensis* en diferentes condiciones ambientales y compararla con otras cepas bacterianas conocidas por su eficiencia en biorremediación. Asimismo, las autoridades ambientales y las industrias deben considerar la implementación de técnicas de biorremediación utilizando microorganismos como parte de sus estrategias para gestionar los suelos contaminados. Por añadidura, es fundamental promover programas de educación, concienciación y sensibilización sobre los efectos de la contaminación por hidrocarburos y las soluciones sostenibles disponibles, incluyendo el uso de la biorremediación. De la misma forma, es importante fomentar colaboraciones entre biotecnólogos, ingenieros ambientales y responsables políticos para desarrollar políticas efectivas que integren la biorremediación en las prácticas de gestión ambiental en Ecuador.
- Finalmente, se recomienda que, aunque *Pseudomona koreensis* muestra resultados favorecedores para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, es necesario continuar explorando su capacidad e eficiencia frente a otros contaminantes y en diferentes contextos ambientales para validar su uso en programas de biorremediación a gran escala.

## Referencias Bibliográficas

- Abellán, J. J., Martínez-Beneito, M. A., Zurriaga, O., Jorques, G., Ferrándiz, J., & López-Quílez, A. (2002). Procesos puntuales como herramienta para el análisis de posibles fuentes de contaminación. *Gaceta Sanitaria*, 16(5), 445-449. [https://doi.org/10.1016/S0213-9111\(02\)71956-0](https://doi.org/10.1016/S0213-9111(02)71956-0)
- Acuña, J., Vargas, J. A., Gómez, E., & García, J. (2004). Hidrocarburos de petróleo, disueltos y dispersos, en cuatro ambientes costeros de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 52, 43-50.
- Aguirre, Z. (2017). Biodiversidad del Ecuador. *Arnaldoa*, 24(2), 523-542. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.242.24206>
- Alvarez, H. M. (2015). *Biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos: Un proceso*.
- Álvarez, S. P., Arbelo, O. C., Pérez, M. E., & Quezada, G. Á. (2015). *Pseudomonas fluorescens Migula, ¿control biológico o patógeno?* 30(3).
- Amaringo, F., Narváez, J. F., Gómez-Arguello, M. A., & Molina, F. (2019). Contaminación en agua y sedimentos por hidrocarburos aromáticos policíclicos: Revisión de la dinámica y los métodos analíticos. *Gestión y Ambiente*, 22(1), 129-140. <https://doi.org/10.15446/ga.v22n1.77874>
- Antona, P. J. P. (2015). *Caracterización taxonómica de nuevas cepas del género Pseudomonas*.
- Avalos, A. M., & Padilla, A. M. G. (2015). Biodegradación De Petróleo Diesel-2 En Agua De Mar Por *Pseudomonas Aeruginosa* En Un Biorreactor Aireado Y Agitado. *Sciéndo*, 18(1), Article 1. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/sciencdo/article/view/1327>
- Babu, A. G., Shea, P. J., Sudhakar, D., Jung, I.-B., & Oh, B.-T. (2015). Potential use of *Pseudomonas koreensis* AGB-1 in association with *Miscanthus sinensis* to remediate

- heavy metal(loid)-contaminated mining site soil. *Journal of Environmental Management*, 151, 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.12.045>
- Barrios, Y., Toledo, H. F., Abalos, A., Acosta, S., & Sánchez, M. I. (2022). Aplicación de ramnolípidos de *Pseudomonas* sp. Y3-B1A en la biodegradación de hidrocarburos a diferentes escalas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. <https://doi.org/10.20937/RICA.54389>
- Benavides, J., Quintero, G., Guevara, A. L., Jaimes, D. C., Gutiérrez, S. M., & Miranda, J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5), 82-90. <https://doi.org/10.22490/24629448.351>
- Bustamante, G., & Silva, J. (2019). *Efecto de la materia orgánica en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en establecimientos de servicio*. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Carvajal, G., Medina, S., Viteri, J., & Salazar, R. (2017). Composición elemental de mezclas biodiésel-diésel y análisis de sus emisiones de combustión. *FIGEMPA: Investigación y Desarrollo*, 1(2), 21-28. <https://doi.org/10.29166/revfig.v1i2.66>
- Castillo, P., Mendoza, A., & Caballero, P. (2012). Análisis de las propiedades fisicoquímicas de gasolina y diesel mexicanos reformulados con Etanol. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 13(3), 293-306. <https://doi.org/10.22201/fi.25940732e.2012.13n3.028>
- Cavazos, J., Pérez, B., & Mauricio, A. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura Sociedad y Desarrollo*, 11(4), 539. <https://doi.org/10.22231/asyd.v11i4.16>
- Conde, D., Liporace, F., & Quevedo, K. (2021). *Biorremediación De Suelos Crónicamente Contaminados Con Hidrocarburos Por La Cepa Autóctona Pseudomonas sp. MT1A3*.

- Cordona, A. (2018, abril 25). *La deforestación de la industria petrolera pone en riesgo al Parque Yasuní / Ecuador*. Noticias ambientales. <https://es.mongabay.com/2018/04/ecuador-deforestacion-petroleo-parque-yasuni/>
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, 2011, 1-13. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>
- Deng, Y., Mou, T., Wang, J., Su, J., Yan, Y., & Zhang, Y.-Q. (2023). Characterization of three rapidly growing novel Mycobacterium species with significant polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation potential. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1225746>
- García, P. E. P., & Cruz, M. I. A. (2012). *Los efectos del cadmio en la salud*.
- Garzón, J. M., Rodríguez Miranda, J. P., & Hernández Gómez, C. (2017). Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible. *Universidad y Salud*, 19(2), 309. <https://doi.org/10.22267/rus.171902.93>
- Hernández, G. M. (2016). Biorremediación de organofosforados por hongos y bacterias en suelos agrícolas: Revisión sistemática. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(1), 139. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol18\\_num1\\_art:564](https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num1_art:564)
- Hurtado, J. A. (2020). Determinación De La Causa Raíz De La Contaminación Difusa Y Puntual De La Calidad De Agua En Bahía Manzanillo, Corregimiento De Cristóbal, Distrito Y Provincia De Colón, Panamá. *Scientia*, 30(2), 1-28. <https://doi.org/10.48204/j.scientia.v30n2a1>
- Idrobo, C. G. (2024). *Evaluación del uso de microorganismos rizosféricos procedentes de páramo andino en la descomposición de las acículas de Pinus patula, Loja, Ecuador*.

- INEN. (2023). 2023 – Servicio Ecuatoriano de Normalización INEN. <https://www.normalizacion.gob.ec/2023/>
- Jaramillo, M., Hernandez, C., & Pico, M. (2018). *Intoxicación por plomo y efectos neurocomportamentales en la asociación de carpinteros ciudad de Tulcán, 2018*. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2218-36202020000500431&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2218-36202020000500431&script=sci_arttext)
- Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., & Brooks, G. F. (2011). *Microbiología médica [de] Jawetz, Melnick y Adelberg (25a ed)*. McGraw-Hill Interamericana.
- Jimenez, V. (2020). *Evaluación De Bacterias Y Hongos Potencialmente Utilizables Para La Biorremediación De Suelos Contaminados Por Hidrocarburos*.
- Kwon, S. W., Kim, J. S., Park, I. C., Yoon, S. H., Park, D. H., Lim, C. K., & Go, S. J. (2003). *Pseudomonas koreensis* sp. Nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. Nov. And *Pseudomonas jinjuensis* sp. Nov., novel species from farm soils in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1), 21-27. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02326-0>
- Loroña, F., Gomez, W., Jaco, E., Reynaga, C., Guiño, M., Gamarra Torres, J., Díaz Huaman, F., Huaman Buitron, N., Rafael Gutierrez, P., Mayte Quispe, J., Moran Carhuapoma, M., & Carhuancho Alzamora, L. C. (2019). Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con Diesel B5 mediante Microorganismo Eficaces (EM). *Cátedra Villarreal*, 6(2), 143-155. <https://doi.org/10.24039/cv201862278>
- MAATE, M. del A., Agua y Transición Ecológica. (2018). *Norma De Calidad Ambiental Del Recurso Suelo Y Criterios De Remediación Para Suelos Contaminados*. <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://faolex.fao.org/docs/pdf/ecu112181.pdf>

- Martínez, A., Pérez, M. E., Pinto, J., Gurrola, B. A., & Osorio, A. L. (2011). Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 27(3), 241-252.
- Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Sánchez, H., Álvarez, H., & Gutiérrez, A. (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. *Acta Bioquím Clín Latinoam*.
- Mayz, J. C., & Manzi, L. V. (2017). Bacterias hidrocarburoclásticas del género *Pseudomonas* en la rizosfera de *Samanea saman* (Jacq.) Merr. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 29-37. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.57408>
- McGenity, T. J., Folwell, B. D., McKew, B. A., & Sanni, G. O. (2012). Marine crude-oil biodegradation: A central role for interspecies interactions. *Aquatic Biosystems*, 8(1), 10. <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-10>
- Moreira, B. S. M. (2023). *Propuesta Límites Permisibles Para La Identificación De Suelos Contaminados En Todas Las Fases De La Industria Hidrocarburífera, Incluidas Las Estaciones De Servicios*.
- Núñez, F., Aguirre, A., Sánchez, C., & Ibarra, J. (2023). *Las Paradojas De La Explotación Petrolera En La Amazonía: Pobreza Y Desigualdad*.
- OPS, & OMS. (2020, octubre 26). *Plomo—OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*. <https://www.paho.org/es/temas/plomo>
- Ortiz, R., Cram, S., & Sommer, I. (2012). *Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (Haps) En Suelos De La Llanura Aluvial Baja Del Estado De Tabasco, México*.
- Paredes, K. I., Santillán, L. M., & Viteri, M. R. (2021). *Degrading capacity of pseudomonas aeruginosa against heavy metals present in sediment samples from the Chibunga river*. 6(5).

- Pérez, M. (2018). *Evaluación de la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando Pseudomonas fluorescens*.
- Petenello, M. C., & Beltrán, C. (2014). *Efecto del agregado de diésel-oil sobre algunos parámetros microbiológicos del suelo con y sin presencia de plantas*.
- Quintero, M., Moreno, E., Delgado, G. E., Fernández, J., Silva, P., & Villegas, J. (2012). Síntesis, caracterización estructural y magnética de la aleación CuAl<sub>0.67</sub>Cr<sub>0.33</sub>S<sub>2</sub>. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 32(2), 292-298.
- RAHO, «Reglamento Sustitutivo del Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador. (2020). *Instructivo para la Calificación y Registro de Consultores Ambientales Hidrocarburíferos*.
- RAHOE, «Reglamento Sustitutivo del Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador. (2001). *Instructivo para la Calificación y Registro de Consultores Ambientales Hidrocarburíferos*.
- Ramírez, I. E. M., Vela, N. A. C., & Rincón, J. J. (2012). *Biodiesel, un combustible renovable*.
- Rodríguez, A., Zárate, S. G., & Bastida, A. (2022). Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar biorremediación. *Revista de Ciencias Ambientales*, 56(1), 178-208. <https://doi.org/10.15359/rca.56/1.9>
- Rodríguez, D. T. (2003a). *El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos*.
- Rodríguez, D. T. (2003b). *El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos*.
- Romaniuk, R., Giuffré, L., & Costantini, A. (2017). *Suelos contaminados con hidrocarburos: Un caso de estudio*.

- Samame, I. (2020). “*Pseudomonas putida Y Penicillium Sp. Para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*”.
- Scott, H. E. M., Aherne, J., & Metcalfe, C. D. (2012). Fate and Transport of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Upland Irish Headwater Lake Catchments. *The Scientific World Journal*, 2012, 828343. <https://doi.org/10.1100/2012/828343>
- Sierra. (2023, junio 27). *Una remediación pendiente: La contaminación de la industria petrolera no se atiende pese a la legislación vigente*. Noticias ambientales. <https://es.mongabay.com/2023/06/remediacion-pendiente-contaminacion-industria-petrolera-no-se-atende/>
- Solá, A. Z., Menéndez, J. M., Pérez, P. R., Iglesias, S. G., & Borrás, A. S. (2018). *Revisión de la literatura sobre efectos nocivos de la exposición laboral a hidrocarburos en trabajadores en ambiente externo*.
- Tecnología EM<sup>TM</sup>, M. E. (2019). *Tecnología EM<sup>TM</sup> – Microorganismos Eficazes*. <https://www.em-la.com/>
- Vallejo, V., Salgado, L., & Roldan, F. (2005). Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(2), Article 2.
- Vizuite, R. A., Pascual, A. E., Taco, C. W., & Morales, M. M. (2020). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a base de bacterias utilizadas como bioproductos. *Revista Lasallista de Investigación*, 17(1), 177-187. <https://doi.org/10.22507/rli.v17n1a19>
- Zamora, A., Ramos, J., & Arias, M. (2012). Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro*, 24(1), 5-12.



Zhang, L., Ma, Y., Vojta, S., Morales-McDevitt, M., Hoppmann, M., Soltwedel, T., Kirk, J., De Silva, A., Muir, D., & Lohmann, R. (2023). Presence, Sources and Transport of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Arctic Ocean. *Geophysical Research Letters*, 50(1), e2022GL101496. <https://doi.org/10.1029/2022GL101496>

## Anexos

### Anexo A Certificado procesamiento de muestra



Cuenca, 22 de julio de 2024

A quien corresponda

Quien suscribe el presente certifica que las siguientes muestras fueron analizadas bajo la técnica MALDI TOF (Espectrometría de Masas) avalada por la Organización Mundial de la Salud como prueba Gold Standard para identificación de cepas microbiológicas.

ITEM	Código MEDICULT	MUESTRA ANALIZADA	I.D.	MICROORGANISMO ENCONTRADO	NIVEL DE CONFIANZA	METODO INTERNO	METODO DE REFERENCIA
1	00020724	Cepa Aislada	Cepa Bacteria	<i>Pseudomona koreensis</i>	99.9%	MEDI-MI-21	MALDI TOF

El analista se responsabiliza exclusivamente de los análisis realizados, el resultado es válido solo para la muestra recibida por el laboratorio.



**BQF. Paúl León Cajamarca, MSc**  
Analista Técnico

pág.2

(07) 4096158  
099 868 1806  
medicult.cuenca@gmail.com

## Anexo B Reporte de Análisis Microbiológico



### REPORTE DE ANALISIS MICROBIOLÓGICO

MAC02072024-IR029  
OTN: G1-020724

<b>Cliente:</b>	Daniela Elizabeth Ruiz Ruiz		
<b>Atención:</b>	-		
<b>Dirección:</b>	Loja		
<b>Teléfono:</b>	0980548136		
<b>Identificación de la muestra</b>			
<b>Tipo de Muestra:</b>	Cepas de Bacteria	<b>Fecha de Recepción:</b>	2024-07-02
<b>Descripción</b>	Cepa aislada recibida en condiciones de conservación	<b>Fecha de Análisis:</b>	2024-07-03
		<b>LOTE:</b>	G1-02072024
		<b>Muestreado por:</b>	Cliente
<b>Condiciones de recepción:</b>	Eppendorf a temperatura de congelación	<b>Fecha de Siembra:</b>	2024-07-03
<b>Material de Envase</b>	Plastico a congelación en medio de transporte		

#### CARACTERISTICAS ORGANOLÉPTICAS

Morfología	Olor	Estado	Colonias Declaradas	Colonias Encontradas
Bacterias con colonias definidas	Característico	Vivo	-----	Variable

#### RESULTADOS IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA

ITEM	Código MEDICULT	MUESTRA ANALIZADA	I.D.	MICROORGANISMO ENCONTRADO	NIVEL DE CONFIANZA	METODO INTERNO	METODO DE REFERENCIA
1	00020724	Cepa Aislada	Cepa Bacteria	<i>Pseudomona koreensis</i>	99.9%	MEDI-MI-21	MALDI TOF



FORMA AUTENTICADA DEL  
PAUL ADRIAN LEÓN  
CAJAMARCA

**BQF. Paúl León Cajamarca, MSc**  
Analista Técnico

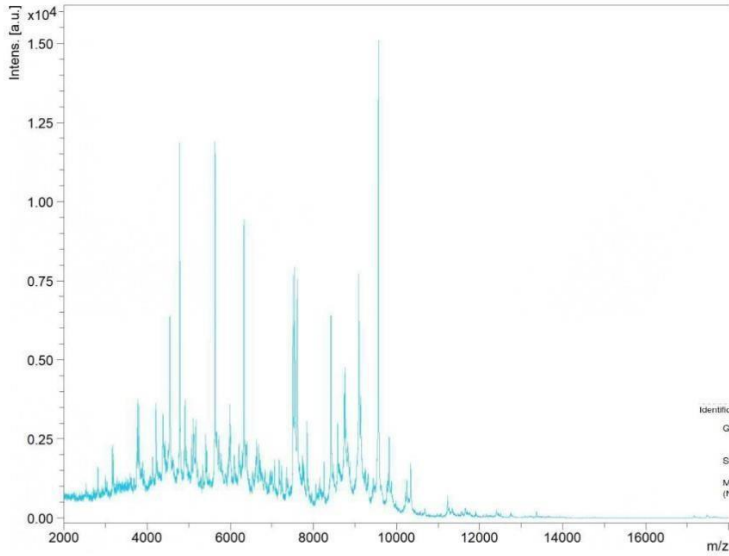
El analista se responsabiliza exclusivamente del resultado emitido, el resultado es válido solo para la muestra recibida por el laboratorio. Prohibida su reproducción parcial o total por cualquier motivo sin permiso por escrito del laboratorio.

pág.1

(07) 4096158  
099 868 1806

medicult.cuenca@gmail.com

**Anexo C Perfil espectro métrico de identificación de *Pseudomonas koreensis* obtenido a través de espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF )**



m/z	S/N	Q	R	Int	Ar	Target
		ua	es	ea	Position	E11
		lit	.	s.		
		y				
		F				
		ac				

**Laser**  
 Laser beam attenuation 69.444  
 Laser repetition rate 60 Hz  
 Number of shots 240

**Spectrometer**  
 positive voltage polarity POS  
 PIE delay 130 ns  
 Ion source voltage 1 20 kV  
 Ion source voltage 2 17.95 kV  
 Lens voltage 6.6 kV  
 Linear detector voltage 2.811 kV  
 Deflection on  
 Deflection mass  
 SampleRate 2 ns

**Instrument**  
 Instrument type microflex  
 Serial instrument number 269944.00487  
 Name of computer MBT-WIN10-LTSC  
 Operator ID or name mbtuser  
 flexControl version flexControl 3.4.207.20  
 flexAnalysis version

Identificación de Bacterias por MALDI TOF

GERMEN IDENTIFICADO	PSEUDOMONAS koreensis
SCORE	2.22
MUESTRAS RECIBIDAS (NO obtenidas en el Laboratorio)	

Date of Acquisition 2024-07-03 7T12:17:58.153-05:00  
 Acquisition method D:\Methods\flexControlMethods\MBT\_FC.par  
 Processing method  
 File Name D:\Data\MaldiBiotyperRealTimeClassification\0be427f4-d59a-484e-8247-03d58dfdb9a9\797f57fd-1787-46ca-a067-c4a250c01ee6\0\_E11

## Anexo D Análisis de Hidrocarburos Totales de Petróleo



CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES  
CENTROCESAL Cia. Ltda.  
AREA QUÍMICA

INFORME DE ENSAYO No.: 58754-01-24-09-24-Q

### Datos del Cliente

**Cliente:** RUIZ RUIZ DANIELA ELIZABETH  
**Representante:** DANIELA RUIZ  
**Dirección:** LOJA / LOJA / SAN SEBASTIAN / PEDRO VICENTA MALDONADO S/N Y REINALDO ESPINOZA  
**Teléfono:** 0980548136

### Datos del ítem de Ensayo

**Identificación de la Muestra:** MUESTRA ST  
**Descripción de la Muestra:** Sólido heterogéneo color café oscuro  
**Contenido declarado:** 1Kg  
**Conservación de la Muestra:** Ambiente  
**No. Lote o código:** ND  
**Fecha de elaboración:** ND  
**Fecha de caducidad:** ND

### Datos de Muestreo, Recepción y Análisis

**Responsable toma de muestra:** Por el cliente  
**Fecha toma de muestra:** ND  
**Responsable muestreo:** NA  
**Fecha de recepción:** 2024-09-24  
**Referencia:** Los resultados se aplican a la muestra tal cual como se recibió  
**Fechas de ensayo:** 2024-10-15  
**Parámetros acreditados muestreo:** NA  
**Fecha de reporte:** 2024-10-21

### Información relevante proporcionada por el cliente

1. Información proporcionada por el cliente: NA
2. Requisitos de recepción que afectan al ensayo: NA

Resultados analíticos:

Pag.: 1 de 1

PARÁMETRO	MÉTODO	UNIDADES	RESULTADO
TPH	POE 7.2.58 EPA METHOD 8015B, NONNHALOGENATED USING GC-FID MODIFICADO	mg/kg	1453 ± 189

Laboratorio de ensayo de acreditado por el SAE con acreditación No. SAE LEN 12-001  
Los resultados marcados con (\*) NO están incluidos en el alcance de acreditación

### Observaciones:

1. **Resultado:** Expresado como a) R; donde R corresponde al resultado ó b) R +/- U; donde R corresponde al resultado y U a la incertidumbre con K=2, 95% de confianza
2. **Métodos:** EPA METHOD 8015B, NONNHALOGENATED USING POE: Procedimiento Interno
3. **Responsables de análisis:** CT

### Notas:

- ND: No declara NA: No aplica**
- NOTA 1: Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.
- NOTA 2: Los ensayos son realizados a temperatura ambiente excepto donde se especifique. Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis
- NOTA 3: Muestras recibidas en el laboratorio e información de las mismas proporcionada por el cliente. CENTROCESAL Cia. Ltda, se responsabiliza únicamente de los análisis
- NOTA 4: La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.
- NOTA 5: El tiempo de permanencia de las muestras en el laboratorio corresponde a perecibles: 48 horas y no perecibles: 20 días desde la entrega del resultado.
- NOTA 6: Todas las actividades son realizadas en las instalaciones del laboratorio excepto donde se especifique
- NOTA 7: Toda información que sea proporcionada por el cliente y que afecta a la validez resultados, es exclusiva responsabilidad de quienes las emiten y no representa responsabilidad para CENTROCESAL

Q.F. Andrea Cumba A.  
RESPONSABLE DE SUPERVISIÓN



CENTROCESAL Cia. Ltda.  
f.ref.: POE:7.8.1 Rev.:07 Anexo 1

Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio

Ignacio de Asín N52/208 y Gonzalo Valdivieso  
Telfs: (+593) 02 5003838 Celular: 0999649872 - 0993417407  
e-mail: info@centrocesal.com / www.centrocesal.com  
QUITO - ECUADOR



CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES  
CENTROCESAL Cia. Ltda.  
AREA QUÍMICA

INFORME DE ENSAYO No.: 58754-02-24-09-24-Q

Datos del Cliente

**Cliente:** RUIZ RUIZ DANIELA ELIZABETH  
**Representante:** DANIELA RUIZ  
**Dirección:** LOJA / LOJA / SAN SEBASTIAN / PEDRO VICENTA MALDONADO S/N Y REINALDO ESPINOZA  
**Teléfono:** 0980548136

Datos del ítem de Ensayo

**Identificación de la Muestra:** MUESTRA T1  
**Descripción de la Muestra:** Sólido heterogéneo color café oscuro  
**Contenido declarado:** 1Kg  
**Conservación de la Muestra:** Ambiente  
**No. Lote o código:** ND  
**Fecha de elaboración:** ND  
**Fecha de caducidad:** ND

Datos de Muestreo, Recepción y Análisis

**Responsable toma de muestra:** Por el cliente  
**Responsable muestreo:** NA  
**Referencia:** Los resultados se aplican a la muestra tal cual como se recibió  
**Parámetros acreditados muestreo:** NA  
**Fecha toma de muestra:** ND  
**Fecha de recepción:** 2024-09-24  
**Fechas de ensayo:** 2024-10-15  
**Fecha de reporte:** 2024-10-21

Información relevante proporcionada por el cliente

1. Información proporcionada por el cliente: NA
2. Requisitos de recepción que afectan al ensayo: NA

Resultados analíticos:

Pag.: 1 de 1

PARÁMETRO	MÉTODO	UNIDADES	RESULTADO
TPH	POE 7.2.58 EPA METHOD 8015B, NONNHALOGENATED USING GC-FID MODIFICADO	mg/kg	685 ± 89

Laboratorio de ensayo de acreditado por el SAE con acreditación No. SAE LEN 12-001  
Los resultados marcados con (\*) NO están incluidos en el alcance de acreditación

Observaciones:

1. **Resultado:** Expresado como a) R; donde R corresponde al resultado ó b) R +/- U; donde R corresponde al resultado y U a la incertidumbre con K=2, 95% de confianza
2. **Métodos:** EPA METHOD 8015B, NONNHALOGENATED USING POE: Procedimiento Interno
3. **Responsables de análisis:** CT

Notas:

- ND: No declara** **NA: No aplica**
- NOTA 1: Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.
- NOTA 2: Los ensayos son realizados a temperatura ambiente excepto donde se especifique. Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis
- NOTA 3: Muestras recibidas en el laboratorio e información de las mismas proporcionada por el cliente. CENTROCESAL Cia. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis
- NOTA 4: La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.
- NOTA 5: El tiempo de permanencia de las muestras en el laboratorio corresponde a perecibles: 48 horas y no perecibles: 20 días desde la entrega del resultado.
- NOTA 6: Todas las actividades son realizadas en las instalaciones del laboratorio excepto donde se especifique
- NOTA 7: Toda información que sea proporcionada por el cliente y que afecta a la validez resultados, es exclusiva responsabilidad de quienes las emiten y no representa responsabilidad para CENTROCESAL.

Q.F Andrea Cumba A.  
CENTROCESAL Cia. Ltda.

RESPONSABLE DE SUPERVISIÓN



ref: POE-7.8.1 Rev. 07 Anexo 1

Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio

Ignacio de Asín N52/208 y Gonzalo Valdivieso  
Telfs: (+593) 02 5003838 Celular: 0999649872 - 0993417407  
e-mail: info@centrocesal.com / www.centrocesal.com  
QUITO - ECUADOR



CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES  
CENTROCESAL Cia. Ltda.  
AREA QUÍMICA

INFORME DE ENSAYO No.: 58754-03-24-09-24-Q

Datos del Cliente

**Cliente:** RUIZ RUIZ DANIELA ELIZABETH  
**Representante:** DANIELA RUIZ  
**Dirección:** LOJA / LOJA / SAN SEBASTIAN / PEDRO VICENTA MALDONADO S/N Y REINALDO ESPINOZA  
**Teléfono:** 0980548136

Datos del ítem de Ensayo

**Identificación de la Muestra:** MUESTRA T2  
**Descripción de la Muestra:** Sólido heterogéneo color café oscuro  
**Contenido declarado:** 1Kg **No. Lote o código:** ND  
**Conservación de la Muestra:** Ambiente **Fecha de elaboración:** ND  
**Fecha de caducidad:** ND

Datos de Muestreo, Recepción y Análisis

**Responsable toma de muestra:** Por el cliente **Fecha toma de muestra:** ND  
**Responsable muestreo:** NA **Fecha de recepción:** 2024-09-24  
**Referencia:** Los resultados se aplican a la muestra tal cual como se recibió **Fechas de ensayo:** 2024-10-15  
**Parámetros acreditados muestreo:** NA **Fecha de reporte:** 2024-10-21

Información relevante proporcionada por el cliente

1. Información proporcionada por el cliente: NA
2. Requisitos de recepción que afectan al ensayo: NA

Resultados analíticos:

Pag.: 1 de 1

PARÁMETRO	MÉTODO	UNIDADES	RESULTADO
TPH	POE 7.2.58 EPA METHOD 8015B, NONHALOGENATED USING GC-FID MODIFICADO	mg/kg	957

Laboratorio de ensayo de acreditado por el SAE con acreditación No. SAE LEN 12-001  
Los resultados marcados con (\*) NO están incluidos en el alcance de acreditación

Observaciones:

1. Resultado: Expresado como a) R; donde R corresponde al resultado ó b) R +/- U; donde R corresponde al resultado y U a la incertidumbre con K=2, 95% de confianza
2. Métodos: EPA METHOD 8015B, NONHALOGENATED USING POE: Procedimiento Interno
3. Responsables de análisis: CT

Notas:

- ND: No declara** **NA: No aplica**
- NOTA 1: Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.
- NOTA 2: Los ensayos son realizados a temperatura ambiente excepto donde se especifique. Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis
- NOTA 3: Muestras recibidas en el laboratorio e información de las mismas proporcionada por el cliente. CENTROCESAL Cia. Ltda, se responsabiliza únicamente de los análisis
- NOTA 4: La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.
- NOTA 5: El tiempo de permanencia de las muestras en el laboratorio corresponde a perecibles: 48 horas y no perecibles: 20 días desde la entrega del resultado.
- NOTA 6: Todas las actividades son realizadas en las instalaciones del laboratorio excepto donde se especifique
- NOTA 7: Toda información que sea proporcionada por el cliente y que afecta a la validez resultados, es exclusiva responsabilidad de quienes las emiten y no representa responsabilidad para CENTROCESAL

Q.F. Andrea Cumba A.  
CENTROCESAL Cia. Ltda.  
RESPONSABLE DE SUPERVISIÓN



ref: POE-7.8.1, Rev. 07, Anexo 1.

Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio

Ignacio de Asín N52/208 y Gonzalo Valdivieso  
Telfs: (+593) 02 5003838 Celular: 0999649872 - 0993417407  
e-mail: [info@centrocesal.com](mailto:info@centrocesal.com) / [www.centrocesal.com](http://www.centrocesal.com)  
QUITO - ECUADOR

## Anexo E Análisis de plomo en suelo contaminado con hidrocarburo



**ESTACION EXPERIMENTAL TROPICAL "PICHILINGUE"**  
**LABORATORIO DE SUELOS, TEJIDOS VEGETALES Y AGUAS**  
 Km 5 Carretera Quevedo – El Empalme; Apartado 24  
 Quevedo – Ecuador Teléfonos: 783044 783128 Ext. 201

Nombre del Propietario:	RUIZ RUIZ DANIELA ELIZABETH	Teléf.:	0980548136	Reporte N°:	12388
Nombre de la Propiedad:		Cultivo:	Suelos	Fecha de muestreo:	25/09/2024
Localización:		Loja	Loja	Fecha de ingreso:	14/10/2024
	Parroquia	Cantón	Provincia	Fecha salida resultados:	21/10/2024

### RESULTADO DE ANÁLISIS DE PLOMO SEMITOTAL EN SUELO

Número de Laboratorio	Identificación de las Muestras	Pb mg kg <sup>-1</sup>
1363	ST M. Contaminada con diésel inicial	28.9
1364	T1 Tratamiento de muestra contaminada con diésel	24.4
1365	T2 Testigo	24.6

Instrumento de análisis: EAA-HGA (Espectrómetro de absorción atómica acoplado a Horno de Grafito)
Método de extracción en tejido: Agua regia (HNO <sub>3</sub> -HCl) relación 3:1
Límite de detección (LD): 0.06 ug L <sup>-1</sup> Pb
Límite de cuantificación (LC): 0.12 ug L <sup>-1</sup> Pb
Nivel crítico en suelo agrícola: (Pb) 35 mg kg <sup>-1</sup> (TULA, acuerdo Nro. 061, Año II- N.-316, mayo de 2015)

*x. W. [Signature]*  
 RESPONSABLE DPTO.



La muestra será guardada en el Laboratorio por tres meses. Tiempo en el que se acepten reclamos en los resultados.  
 LABORATORISTA



## Anexo F Registro Fotográfico

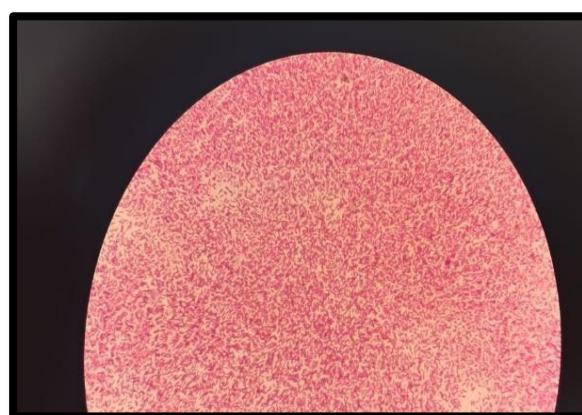
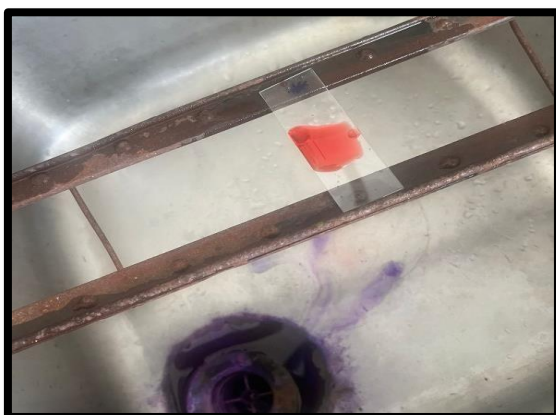
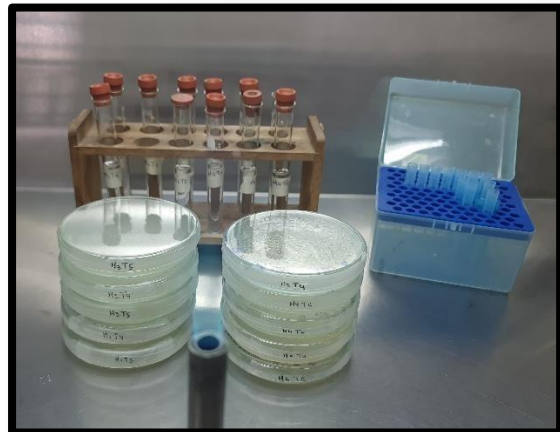
Obtención de muestras



Preparación de medios de cultivo



## Caracterización de los microorganismos del suelo rizosférico





Activación y preparación de la cepa bacteriana



## Calibración del pHmetro



## Medición del pH



## Montaje del ensayo

