

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE  
CHIMBORAZO**



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
AMBIENTAL**

**“EVALUACIÓN DE DOS SUSTRATOS EN LA TÉCNICA DE LANDFARMING  
PARA EL TRATAMIENTO DE SUELOS CONTAMINADOS CON  
HIDROCARBUROS”**

**Tesis de Grado Previo a la obtención del título de:**

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**LISSETTE PAOLA RODRÍGUEZ MUÑOZ**

**Riobamba\*Ecuador**

**2008**

- *A PETROECUADOR y a la ESPOCH.*
- *Al PEPDA por la oportunidad de desarrollar mi proyecto de tesis y su colaboración.*
- *Al Microbiólogo Pablo Serrano, a la Ing. Sandra Navas, al Ing. Patricio Manobanda, a la Blg. Carmen Salvador, al Ing. Bayardo Ortiz, al Dr. Luis Villacreces por su ayuda incondicional durante todo el desarrollo de este trabajo.*
- *A Todos quienes conforman "LACIB" por la colaboración prestada.*
- *A LABPAM por sus recomendaciones y su cooperación.*
- *A los miembros del tribunal de tesis por sus acertadas recomendaciones.*
- *A todos quienes colaboraron con el desarrollo de esta investigación.*

Por sobre todo a mis padres, que con su paciencia, amor y bondad me formaron como una persona de bien e hicieron posible que culmine con mi carrera profesional.

Con todo mi corazón a mis hermanos Diana, Omar y Jorge.

A mis amigos que siempre me apoyaron incondicionalmente.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
Dr. Edmundo Caluña. <b>DECANO FAC. CIENCIAS.</b>	.....	.....
Dr. Robert Cazar. <b>DIRECTOR ESC.CIENCIAS QUÍMICAS.</b>	.....	.....
Dra. Nancy Veloz M. <b>DIRECTORA DE TESIS.</b>	.....	.....
Dra. Jenny Moreno. <b>MIEMBRO DE TRIBUNAL.</b>	.....	.....
Dra. Susana Abdo. <b>MIEMBRO DE TRIBUNAL.</b>	.....	.....
Sr. Carlos Rodríguez. <b>DIRECTOR DEL CENTRO DE DOCUMENTACIÓN.</b>	.....	.....
<b>NOTA DE LA TESIS ESCRITA</b>	.....	.....

*“Yo, Lissette Paola Rodríguez Muñoz, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenecen a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo”.*

---

**LISSETTE PAOLA RODRÍGUEZ MUÑOZ**

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
Al	<i>Aluminio</i>
B	<i>Boro</i>
C	<i>Carbono</i>
C.E.	<i>Conductividad eléctrica</i>
C/N	<i>Relación carbono nitrógeno.</i>
Ca	<i>Calcio</i>
Cd	<i>Cadmio</i>
Cl	<i>Cloro</i>
CO <sub>2</sub>	<i>Dióxido de carbono</i>
COT	<i>Carbono orgánico total</i>
COVs	<i>Compuestos orgánicos volátiles</i>
Cu	<i>Cobre</i>
EIA	<i>Estudio de impacto ambiental</i>
EPA	<i>Agencia de Protección Ambiental</i>
Fe	<i>Hierro</i>
HAPs	<i>Hidrocarburos aromáticos policíclicos</i>
HNO <sub>3(c)</sub>	<i>Acido nítrico concentrado.</i>
K	<i>Potasio</i>
Kg	<i>Kilogramos</i>
LACIB	<i>Laboratorio de Ciencias Biotecnológicas</i>
min	<i>Minutos</i>
Mg	<i>Magnesio</i>
Mn	<i>Manganeso</i>
MO	<i>Materia orgánica</i>
N	<i>Nitrógeno</i>
Na	<i>Sodio</i>
Ni	<i>Níquel</i>
P	<i>Fósforo</i>
PEPDA	<i>Proyecto Eliminación de Piscinas Contaminadas y Limpieza de Derrames en el D.A.</i>
Pb	<i>Plomo</i>
%N	<i>Porcentaje de nitrógeno.</i>
pH	<i>Potencial hidrógeno</i>
RHP	<i>Recuento heterótrofo en placa</i>
S	<i>Azufre</i>
SiO <sub>2</sub>	<i>dióxido de silicio</i>
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<i>Sulfato de sodio anhidro.</i>
T	<i>Testigo</i>
Ti	<i>Titanio</i>
TPH	<i>Hidrocarburos totales de petróleo</i>
V/V	<i>Relación volumen-volumen.</i>
VHR	<i>Víctor Hugo Rúaes.</i>
Zn	<i>Zinc</i>

## ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	14
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>18</b>
MARCO TEÓRICO.....	18
1.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROYECTO DE ELIMINACIÓN DE PISCINAS Y LIMPIEZA DE DERRAMES EN EL DISTRITO AMAZÓNICO (PEPDA) .....	18
1.2 SUELO .....	21
1.3 CONTAMINACIÓN DEL SUELO CON HIDROCARBUROS .....	26
1.4 BIORREMEDIACIÓN DE SUELO.....	30
1.5 SUSTRATO.....	38
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>50</b>
MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
2.1. ELABORACIÓN DE SUSTRATOS .....	50
2.2. ENSAYO EXPERIMENTAL DE BIORREMEDIACIÓN.....	52
2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	54
2.4. RENDIMIENTO DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN.....	56
2.5. MUESTREO .....	57
2.6. MONITOREO .....	58
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>62</b>
PARTE EXPERIMENTAL .....	62
3.1. BOCASHI .....	62
3.2. COMPOST .....	65
3.3. ENSAYO EXPERIMENTAL DE BIORREMEDIACIÓN.....	66
3.4. BIOESTIMULACIÓN .....	69
3.5. BIOAUMENTACIÓN.....	71
3.6. MEDICIÓN DE VARIABLES .....	73

<b>CAPÍTULO IV</b> .....	80
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	80
4.1 ELABORACIÓN DE BOCASHI .....	80
4.2 CARACTERIZACIÓN DE SUSTRATOS .....	83
4.3 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS .....	86
4.4 ENSAYO EXPERIMENTAL DE BIORREMEDIACIÓN .....	89
4.5 ESTUDIO DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS APLICANDO DOS SUSTRATOS MEDIANTE LANDFARMING .....	91
4.6 RENDIMIENTO DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN .....	110
<b>CAPÍTULO V</b> .....	115
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	115
5.1. CONCLUSIONES .....	115
5.2. RECOMENDACIONES .....	117
<b>CAPÍTULO VI</b> .....	119
RESUMEN .....	119
SUMARY .....	120
<b>CAPÍTULO VII</b> .....	122
BIBLIOGRAFÍA .....	122
<b>CAPÍTULO VIII</b> .....	128
ANEXOS .....	128

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro N° 1</b>	Cantidad de materiales empleados en la fabricación de bocashi. ....	80
<b>Cuadro N° 2</b>	Control de pH, temperatura y aireación durante el proceso de fermentación del Bocashi. ....	81
<b>Cuadro N° 3</b>	Resultados de la caracterización de los dos sustratos. ....	86
<b>Cuadro N° 4</b>	Resultados de la caracterización del suelo contaminado con hidrocarburos.....	88
<b>Cuadro N° 5</b>	Caracterización morfológica de las cepas bacterianas.....	90
<b>Cuadro N° 6</b>	Descripción macroscópica de las cepas bacterianas .....	90
<b>Cuadro N° 7</b>	Concentración de TPH (mg/Kg).....	92
<b>Cuadro N° 8</b>	Comparación múltiple de Tukey para TPH en el cuarto mes de biorremediación.	94
<b>Cuadro N° 9</b>	Concentración de cadmio (mg/Kg). ....	95
<b>Cuadro N° 10</b>	Comparación múltiple de Tukey para cadmio en el segundo mes de biorremediación.....	97
<b>Cuadro N° 11</b>	Concentración de níquel (mg/Kg). ....	98
<b>Cuadro N° 12</b>	Comparación múltiple de Tukey para níquel en el cuarto mes de biorremediación.....	100
<b>Cuadro N° 13</b>	Concentración de plomo (mg/Kg). ....	101
<b>Cuadro N° 14</b>	Comparación múltiple de Tukey para plomo en el cuarto mes de biorremediación.....	102
<b>Cuadro N° 15</b>	Control de RHP (UFC/g de suelo) durante el proceso de biorremediación. ....	103

<b>Cuadro N° 16</b> Control de temperatura del suelo (°C) durante el proceso de biorremediación. .	105
<b>Cuadro N° 17</b> Control de pH del suelo durante el proceso de biorremediación. ....	106
<b>Cuadro N° 18</b> Control de temperatura (°C) y humedad ambiental (%) durante el proceso de biorremediación en el área de experimentación.....	108
<b>Cuadro N° 19</b> Resultados de rendimiento de cada tratamiento para las variables respuesta...	110
<b>Cuadro N° 20</b> Porcentaje de nitrógeno de los materiales usados en el bocashi. ....	128

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico N° 1.</b> Variación de temperatura (°C) durante el proceso de elaboración de bocashi. ....	82
<b>Gráfico N° 2.</b> Variación de pH durante el proceso de elaboración de bocashi. ....	83
<b>Gráfico N° 3.</b> Variación de TPH (mg/Kg) durante el proceso de biorremediación. ....	93
<b>Gráfico N° 4.</b> Variación de cadmio (mg/Kg) durante el proceso de biorremediación. ....	96
<b>Gráfico N° 5.</b> Variación de níquel (mg/Kg) durante el proceso de biorremediación. ....	98
<b>Gráfico N° 6.</b> Variación de plomo (mg/Kg) durante el proceso de biorremediación. ....	101
<b>Gráfico N° 7.</b> Variación de RHP (UFC/g de suelo) durante el proceso de biorremediación. ....	104
<b>Gráfico N° 8.</b> Variación de la temperatura del suelo (UFC/g de suelo) durante el proceso de biorremediación. ....	105
<b>Gráfico N° 9.</b> Variación del pH del suelo durante el proceso de biorremediación. ....	107
<b>Gráfico N° 10.</b> Variación de la temperatura ambiental (°C) en el área de experimentación. ....	109
<b>Gráfico N° 11.</b> Variación de la humedad ambiental (%) en el área de experimentación. ....	109
<b>Gráfico N° 12.</b> Rendimiento de la biorremediación para TPH. ....	111
<b>Gráfico N° 13.</b> Rendimiento de la biorremediación para cadmio (2 meses). ....	112
<b>Gráfico N° 14.</b> Rendimiento de la biorremediación para níquel. ....	112
<b>Gráfico N° 15.</b> Rendimiento de la biorremediación para plomo. ....	113

## ÍNDICES DE TABLAS

<b>Tabla I.</b>	Rangos de interpretación de resultados de pH.....	24
<b>Tabla II.</b>	Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicios. ....	28
<b>Tabla III.</b>	Métodos utilizados para la determinación de parámetros físico químicos y RHP.	59
<b>Tabla IV.</b>	Relación de M.O. Carbón y Humus para la elaboración de bocashi.....	64
<b>Tabla V.</b>	Relación de melaza y levadura para la elaboración de bocashi. ....	64
<b>Tabla VI.</b>	Composición del Agar Nutritivo, DIFCO, TM .....	129
<b>Tabla VII.</b>	Formula de Medio Mineral para 1L pH 7 .....	129

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: RESULTADOS.....	128
ANEXO B: TABLAS ADICIONALES .....	129
ANEXO C: ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	130
ANEXO D: FOTOGRAFÍAS.....	148

## INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de la Industria Hidrocarburífera en el Ecuador se ha generado graves problemas ambientales, principalmente en las provincias de Sucumbíos, Orellana y Pastaza, en donde se llevan a cabo las operaciones de exploración, producción y refinamiento del crudo.

Durante el proceso de explotación de hidrocarburos, a cargo de TEXACO y posteriormente de las empresas estatales CEPE, PETROAMAZONAS y PETROPRODUCCIÓN, se excavaron numerosas piscinas en las que se depositaron desechos hidrocarburíferos, agua, crudo y lodos de perforación, algunas fueron abandonadas a la intemperie o taponadas, en algunos casos por más de treinta años, constituyendo en la actualidad pasivos ambientales. Debido a los problemas ambientales ocasionados por la presencia de estas piscinas, PETROECUADOR aprueba el Proyecto de Eliminación de Piscinas Contaminadas y Limpieza de Derrames, D.A. (PEPDA), iniciando sus actividades en el mes de junio del 2005 (21).

La primera fase del PEPDA se inicia en el Campo Sacha, en donde se han intervenido 67 piscinas y se están remediando 33. Actualmente el PEPDA opera en los Campos Sacha, Lago Agrio, Libertador, Cuyabeno, Shushufindi, VHR, Sansahuari, Cuyabeno, Auca, Yuca y Cononaco, en los cuales se han intervenido 202 piscinas, estos datos fueron recopilados del reporte semanal de avance de trabajo del DA-PEPDA del 10 de marzo del 2008.

El proceso de recuperación de piscinas incluye ocho etapas, la cuarta de ellas corresponde al tratamiento del suelo contaminado con hidrocarburos con la utilización de técnicas de biorremediación (12).

El objetivo de la biorremediación es disminuir la concentración de hidrocarburos totales de petróleo (TPH), utilizando la capacidad de ciertos microorganismos para su degradación total o parcial, al utilizar a los hidrocarburos como fuente de carbono y energía en sus procesos metabólicos, minimizando su movilidad, toxicidad e impacto ambiental (2).

La técnica utilizada por PEPDA es el landfarming en lechos y en plataformas, tecnología ex situ que permite tratar suelos con un contenido menor a 50.000 ppm en (TPH), aplicando procesos de bioestimulación (adición de nutrientes) y bioaumentación (adición de bacterias nativas degradadoras de hidrocarburos) (13).

En busca de una alternativa para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante la técnica de Landfarming, en esta investigación se evaluó dos sustratos orgánicos, el compost elaborado por el área de abonos del PEPDA y el bocashi, ambos en tres concentraciones.

El ensayo experimental se llevó a cabo en PEPDA, localizado en la Estación Sacha Central de PETROPRODUCCIÓN D.A. en las coordenadas referenciales 291095 E y 9963442 N, a 279 m.s.n.m., en un área aproximada de 120 m<sup>2</sup>, con un tiempo de duración de seis meses.

Durante el proceso de biorremediación se controló las variables respuesta como lo son: los TPH, y metales pesados (Cd, Ni, Pb), parámetros establecidos en la tabla 6 del RAOH (decreto1215) y los parámetros de control como el RHP, el pH y la temperatura del suelo, la temperatura y humedad ambiental.

La biorremediación se complementó aplicando procesos de bioestimulación con la utilización de urea y bioaumentación con un consorcio bacteriano nativo degradador de hidrocarburos.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar dos sustratos orgánicos en la técnica de landfarming para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Elaborar el sustrato B (Bocashi) mediante técnicas de compostaje.
- Caracterizar físico química y microbiológicamente el sustrato a1 (Compost) y el sustrato a2 (Bocashi).
- Caracterizar físico química y microbiológicamente el suelo contaminado con hidrocarburos utilizado en el ensayo experimental.
- Evaluar el grado de descontaminación durante el proceso de biorremediación por la técnica de landfarming.
- Determinar el grado de rendimiento del proceso de biorremediación.
- Evaluar el sustrato más efectivo para el proceso de landfarming.

# CAPÍTULO I

# **CAPÍTULO I**

## **MARCO TEÓRICO**

### **1.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROYECTO DE ELIMINACIÓN DE PISCINAS Y LIMPIEZA DE DERRAMES EN EL DISTRITO AMAZÓNICO (PEPDA)**

La Empresa Estatal PETROECUADOR a través de su filial PETROPRODUCCIÓN basado en el artículo 86 de la Constitución Política del Estado, aprueba y pone en ejecución el Proyecto Eliminación de Piscinas Contaminadas y Limpieza de Derrames en el Distrito Amazónico "PEPDA". Este proyecto se presentó a las Autoridades de la Dirección Nacional de Protección Ambiental DINAPA, y fue aprobado en octubre del 2002, sus actividades las inicia en el mes de junio del 2005, a la presente opera en los Campos Sacha, Lago Agrio, Shushufindi, VHR, Sansahuari, Cuyabeno, Auca, Yuca y Cononaco (9) (27).

Actualmente, el PEPDA es un proyecto dedicado a eliminar y remediar las piscinas contaminadas con hidrocarburos en sus áreas de operación. Además la intervención en la contingencia y posterior limpieza y remediación de derrames (9).

#### **1.1.1. UBICACIÓN DEL CAMPO SACHA**

El Campo Sacha de PETROPRODUCCIÓN se localiza en la Provincia Francisco de Orellana, Cantón Joya de los Sachas, cubre una extensión de 136,6 Km<sup>2</sup>, con una elevación de 249 m.s.n.m. (9).

### **1.1.2. CONDICIONES CLIMÁTICAS**

El área de aplicación del PEPDA se encuentra en la zona de vida de bosque húmedo tropical (clasificación bioclimática de Holdrige), la temperatura media anual oscilan entre 24 y 26 °C, la precipitación anual de 2.000 a 4.000 mm. La humedad ambiental tiene un orden del 80 % (9).

### **1.1.3. ETAPAS PARA LA ELIMINACIÓN DE LAS PISCINAS**

Dentro de las actividades que realiza el PEPDA para la eliminación de piscinas se contempla la ejecución de ocho etapas (27):

- a) Primera Etapa: Desbroce, recolección y lavado de desechos sólidos.
- b) Segunda etapa: Tratamiento, succión y transporte de fluidos.
- c) Tercera Etapa: Tratamiento y recuperación de crudo (PTRCI).
- d) Cuarta Etapa: Limpieza y remediación de suelo contaminado.
- e) Quinta Etapa: Monitoreo de la descontaminación.
- f) Sexta Etapa: Taponamiento y reconfiguración.
- g) Séptima Etapa: Revegetación del área de la piscina.
- h) Octava Etapa: Documentación del proyecto y certificación de eliminación de piscinas.

### **1.1.4. LIMPIEZA DEL SUELO CONTAMINADO (10)**

La limpieza de paredes y fondo de la piscina se realiza mediante lavado con agua recirculada a presión, proceso que se continúa hasta que las pruebas de laboratorio demuestren que los parámetros de contaminación se hallan bajo los límites permisibles del RAOH, Decreto 1215.

El suelo que no puede ser descontaminado mediante lavado, es removido con ayuda de maquinaria pesada y luego transportado al área de landfarming para su posterior tratamiento biológico.

El suelo es biorremediado utilizando la técnica de landfarming en plataformas de tratamiento, se tratan volúmenes entre 200 y 900 m<sup>3</sup> de suelo por plataforma en un período aproximado de 7 meses, además el tratamiento en lechos, aplicado a un volumen de suelo aproximado de 25 m<sup>3</sup> obteniendo resultados en un período de tiempo de 3 a 4 meses.

El suelo dispuesto en las unidades de tratamiento (lechos y plataformas) es homogenizado con materiales esponjantes, durante el proceso se aplica *bioestimulación* y *bioaumentación* con bacterias nativas degradadoras de hidrocarburos. Se efectúa el control de parámetros determinantes como pH, temperatura, humedad y aireación. Además el monitoreo de la concentración de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) para verificar la disminución del contaminante y el número de poblaciones de bacterias del suelo. Una vez que la concentración de parámetros en el suelo se encuentra por debajo de límite permisible establecido en la Tabla 6 del RAOH, Decreto 1215, se da por terminado el proceso de biorremediación.

#### **1.1.5. LABORATORIO DE CIENCIAS BIOTECNOLÓGICAS LACIB- PEPDA (10)**

El Laboratorio de Ciencias Biotecnológicas LACIB, perteneciente al PEPDA, es el área en el que se lleva a cabo el estudio técnico para la aplicación del tratamiento biológico en el suelo.

Las muestras de suelo obtenidas de las piscinas intervenidas en cada campo son superficiales y compuestas, transportadas en cadena de frío al LACIB para su procesamiento microbiológico, en

el cual se aísla, caracteriza e identifica bacterias degradadoras de hidrocarburos, se conforma consorcios bacterianos de cepas nativas, se realiza la masificación en un reactor biológico y la aplicación en el campo.

## **1.2 SUELO**

El término suelo se refiere al material suelto de la superficie de la tierra, formado por una agregación de minerales no consolidados, agua aire, materia orgánica y organismos vivos. La fase mineral suponen más del 50 % del volumen total del suelo, conformada en su mayoría por SiO<sub>2</sub>, Al y Fe y en menor cuantía el Ca, Mg, K, Ti, Mn, Na, N, P y S. El agua y aire conjuntamente constituyen el volumen de poros que varía entre un 25 y 50 % (4).

### **1.2.1. CLASES DE SUELOS**

Los suelos se clasifican de acuerdo al contenido predominante de partículas, clasificadas por su tamaño en arena, limo y arcilla, según las cuales existen las diferentes clases texturales. En general se consideran tres grupos fundamentales: las arenas que incluyen todos los suelos que contengan arena en un 70 % o más de todo el material; las arcillas son suelos con un mínimo de fracción arcillosa del 35 % y el suelo franco de consistencia media. Un suelo franco ideal es una mezcla de partículas de arena, limo y arcilla en iguales proporciones, pero en muchos casos las cantidades de dichas partículas son tales que es necesario modificar el nombre de la clase, así: franco arenoso, franco limoso, franco arcilloso limoso y franco arcilloso (3).

## **1.2.2. CARACTERÍSTICAS DEL SUELO ARCILLOSO**

Las partículas de arcilla están dispuestas en láminas o placas, son plásticas, cohesivas y con una elevada capacidad absorbente para el agua, los gases y sales solubles, la arcilla tiene una elevada actividad superficial; la mayoría son de naturaleza coloidal; tienen una carga superficial negativa; las arcillas se unen a la materia orgánica formando el complejo arcilloso-húmico; son absorbentes, por lo que se reduce la disponibilidad de compuestos orgánicos para la biodegradación (3) (4).

Los suelos arcillosos presentan un tamaño de partícula de 2  $\mu\text{m}$ . Las partículas minerales coloidales del suelo tienen tamaños que van desde 0,5 hasta 0,2  $\mu\text{m}$  como valores promedios, el límite superior es de 1  $\mu\text{m}$ . Siendo así no toda la arcilla es coloidal (3) (4).

Existen dos grupos de arcillas: las arcillas silíceas, característica de las regiones templadas, y las arcillas con óxidos hidratados de hierro y aluminio, que se hallan en trópicos y semitrópicos. Basándose en sus propiedades cristalinas existen tres grandes grupos de arcillas silíceas: caolinita, montmorillonita y micas hidratadas (3).

## **1.2.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS**

### **1.2.3.1. Densidad**

Se puede referir al material sólido que compone el suelo y entonces se habla de densidad real, o a la densidad calculada considerando el espacio total ocupado por los componentes sólidos más el espacio poroso y se denomina densidad aparente. La densidad aparente de los suelos

superficiales son sustancialmente diferentes, oscilan entre 1,00 a 1,60 g/mL; mientras que la densidad real de los sólidos en los suelos minerales oscila entre 2,60 y 2,70 g/mL (3) (4).

La cantidad de materia orgánica en un suelo afecta a la densidad, al pesar mucho menos que un volumen igual de sólidos del minerales (3).

#### **1.2.3.2. Porosidad**

El espacio poroso de un suelo está ocupado por aire y agua. Para la mayor parte de los suelos, la porosidad varía entre 25 y 50 %, sin embargo en los suelos arcillosos varía considerablemente debido a los cambios resultantes de procesos como la expansión, contracción, dispersión, compactación y fisura. Los suelos compactados presentan una porosidad baja (3) (4).

#### **1.2.3.3. Humedad**

En general el agua del suelo se ha clasificado en tres tipos: La gravitacional es la que se desplaza en sentido descendente bajo la influencia de la gravedad, está disponible para microorganismos y plantas, juega un papel muy importante en el transporte. El agua capilar es la que se encuentra retenida en los poros, está disponible para los microorganismos. El agua osmótica es retenida por las partículas de arcilla y humus, ésta no está disponible para los microorganismos ni las plantas (4).

La capacidad de campo definida por Veihmeyer y Hendrickson como la cantidad de agua retenida en un suelo saturado, oscila entre 18 y 30 % en peso en función del contenido de arcilla (4).

#### 1.2.3.4. pH

El pH es el grado de alcalinidad o acidez del suelo, basada en la concentración de iones hidrógeno en solución. El valor del pH en la mayoría de los suelos se encuentra entre 4 y 8 (2).

El balance hídrico de un suelo es decisivo para el pH. Los suelos arcillosos tienden a acidificarse en los climas húmedos, debido al cambio iónico y a la lixiviación de cationes básicos (2) (3).

Una acidez marcada es un síntoma de deficiencia de nutrientes. En suelos con pH menor a 6,5 se reduce la biodisponibilidad de P, Mg, Al, Ca, Mo, B. En suelos con pH mayores a 6,5 se reduce la disponibilidad de Cu, Mn, Zn, Fe, B (13).

**Tabla I.** Rangos de interpretación de resultados de pH.

Interpretación	Rangos
Muy fuertemente ácido	< 4,5
Fuertemente ácido	4,6 a 5,5
Medianamente ácido	5,6 a 6
Ligeramente ácido	6,1 a 6,5
Neutro	6,6 a 7,3
Ligeramente alcalino	7,4 a 7,8
Medianamente alcalino	7,9 a 8,4
Fuertemente alcalino	8,5 a 9
Muy fuertemente alcalino	>9

Fuente: Tabla 4 del libro VI, anexo II. TULAS

#### 1.2.3.5. Conductividad eléctrica

La C.E. es la capacidad que tiene la solución del suelo para conducir la corriente eléctrica (3).

#### **1.2.3.6. Materia orgánica**

La materia orgánica está constituida principalmente de dos grupos: material parcialmente descompuesto y el humus, el primero sujeto al ataque de los microorganismos y el segundo un producto coloidal que poseen una estructura compleja y resistente a transformaciones biológicas adicionales, material de color negro o pardo. La materia orgánica en el suelo oscila entre 3 y 6 % como valor promedio (3) (4).

#### **1.2.3.7. Nutrientes**

Los nutrientes del suelo se agrupan en macronutrientes primarios (N, P y k) y secundarios (Ca, Mg y S) y micronutrientes u oligoelementos (Fe, Mn, Cu, Zn, B, Mo y Cl) (13).

#### **1.2.3.8. Relación Carbono: Nitrógeno (C/N)**

La relación que existe entre la materia orgánica y el contenido de nitrógeno del suelo. Las variaciones de esta relación están influenciadas por las condiciones climáticas, temperatura, cantidad y distribución de lluvias. la relación C/N en climas templados- húmedos cultivados se estabiliza entre 10 a 12/1 (3).

#### **1.2.3.9. Microorganismos**

Los organismos vivos ocupan al menos un 1 % del volumen total del suelo. Existe una gran cantidad de microorganismos en el suelo como bacterias, hongos, algas, actinomicetos y protozoos con diferentes densidades poblacionales. De acuerdo a las condiciones del suelo y la presencia abundante de nutrientes. El número de bacterias en la superficie de los suelos oscila entre  $10^7$  a  $10^{10}$  UFC/g de suelo (4).

### **1.3 CONTAMINACIÓN DEL SUELO CON HIDROCARBUROS**

Suelo contaminado es todo aquel cuyas características físicas, químicas y biológicas naturales, han sido alteradas debido a actividades antropogénicas y representa un riesgo para la salud humana o el medio ambiente (6).

Químicamente, el petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos, formado principalmente por carbono e hidrógeno, con contenidos menores de otros elementos como azufre, oxígeno, nitrógeno o trazas de metales (25).

La contaminación del suelo con hidrocarburos es dinámica, los componentes individuales pueden separarse de la mezcla original, así tenemos que algunos hidrocarburos como los Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs) se evaporan; otros hidrocarburos se solubilizan gracias a la polaridad de sus moléculas; otros compuestos se adsorben en la superficie de la fase sólida del suelo por reacciones químicas o por fuerzas físicas, siendo la primera la que fija los contaminantes, limita el transporte y disminuye la biodisponibilidad para los microorganismos; mientras otros son degradados por microorganismos en el suelo y otros por degradación química. Como resultado de estas transformaciones los hidrocarburos se enriquecen en compuestos pesados, más difíciles de degradar (4).

#### **1.3.1. CONTAMINACIÓN DEL SUELO CON HIDROCARBUROS EN EL ECUADOR**

Antes de 1993, las actividades de exploración y producción de hidrocarburos en el Ecuador, principalmente con el consorcio Texaco-Gulf, luego CEPE-TEXACO y PETROECUADOR-TEXACO, no tenían regulaciones ambientales. Durante este período estas actividades generaron

lo que ahora se identifica como pasivos ambientales. Se registran numerosos derrames, operaciones accidentales y piscinas para depósitos de residuos que en general fueron construidas alrededor de las instalaciones industriales (27).

En el nororiente ecuatoriano existen alrededor de 500 piscinas donde se descargan desechos tóxicos como: desechos de petróleo mezclados con agua, productos químicos, lodos de perforación, chatarra, entre otros, provenientes de la actividad petrolera. Las piscinas fueron abandonadas y causaron contaminación del agua subterránea, de las aguas superficiales (ríos, riachuelos, bebederos, vertientes), alejamiento y disminución de la flora y fauna nativa; afectando además la salud de las poblaciones locales, situación que ha generado conflictos permanentes, entre la Empresa Estatal PETROPRODUCCIÓN filial de PETROECUADOR y la población (9) (22) (27).

### **1.3.2. LEGISLACIÓN APLICABLE**

Con el fin de regular las actividades hidrocarburíferas en el Ecuador, susceptibles de producir impactos ambientales en el área de influencia directa, el Gobierno expide según decreto ejecutivo N° 2982, publicado en el registro oficial N° 766 del 24 de agosto de 1995 el “Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador”, dicho reglamento fue reformado según registro oficial 265 el 13 de febrero del 2001, tomando el nombre de “Reglamento Sustitutivo al Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador” (Decreto N° 1215) (RAOH), actualmente vigente, en el que se incluyen normas técnicas ambientales, parámetros y límites permisibles, formatos, métodos y definiciones de los términos utilizados en la industria hidrocarburífera (5).

Los límites permisibles aplicables a suelos contaminados con hidrocarburos se encuentran en la Tabla 6 del RAOH, Decreto 1215, de acuerdo al uso posterior a darse al suelo remediado, enlistados en la siguiente tabla. (5).

**Tabla II.** *Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicios.*

Parámetro	Expresado en	Unidad	Uso Agrícola	Uso Industrial	Ecosistemas Sensibles
Hidrocarburos totales de Petróleo	TPH	mg/Kg	<2.500	<4.000	<1.000
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	HAPs	mg/Kg	<2	<5	<1
Cadmio	Cd	mg/Kg	<2	<10	<1
Níquel	Ni	mg/Kg	<50	<100	<40
Plomo	Pb	mg/Kg	<100	<500	<80

**Fuente:** Tabla 6 - ROAH, Decreto Ejecutivo N° 1215, Registro Oficial 265 de 13- 02- 2001.

### 1.3.2.1. Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH)

El término TPH se usa para describir a un grupo de sustancias químicas, derivadas del petróleo crudo. Debido al gran número de hidrocarburos involucrados, generalmente no es práctico medir cada uno de ellos, sin embargo, es útil medir la cantidad total del conjunto de hidrocarburos que se encuentran en una muestra de suelo contaminada, que sirve como indicador general del tipo de contaminación del sitio (15).

### **1.3.2.2. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)**

Los HAPs constituyen contaminantes orgánicos, son compuestos estables, tóxicos algunos cancerígenos y mutágenos. Existen dos clases los livianos y los pesados (15).

### **1.3.2.3. Metales Pesados (12)**

Los metales pesados pueden estar presentes como minerales del suelo. Los aportados mediante vertidos actúan según diversos mecanismos, basados en las interacciones de la fase líquida como lo es la adsorción, precipitación, disolución, descomposición biológica y mezcla.

La disponibilidad de los metales pesados está regulada por el intercambio iónico, intercambio de cationes, quelación de la materia orgánica y absorción en las arcillas.

La materia orgánica puede ser considerada como el factor más importante que influye en la sorción y la formación de complejos metálicos, se ha comprobado que los ácidos húmicos y fúlvicos pueden adsorber metales inmovilizándolos.

Existen microorganismos con la capacidad para formar complejos metálicos, otros los encapsulan eliminándolos al medio y otros actúan mediante reacciones químicas, como la oxidación o la reducción.

Los mecanismos de retención de los metales pesados por el suelo consisten en reacciones de precipitación, acumulación en la superficie, oclusión en otros precipitados, unión a vertidos residuales. Dependiendo de diversos factores ecológicos como factores ambientales, factores abióticos y aspectos químicos del suelo.

La solubilidad de los metales pesados depende del pH, O<sub>2</sub>, y de la presión del CO<sub>2</sub>.

## **1.4 BIORREMEDIACIÓN DE SUELO**

La biorremediación constituye una alternativa exitosa para la disposición de suelos contaminados con hidrocarburos, aprovecha la capacidad metabólica de ciertos organismos (plantas, hongos, bacterias) para degradar, transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos (mineralización) o menos tóxicos (biotransformación) para el ambiente y la salud humana. Esta estrategia biológica puede ser aplicada con microorganismos autóctonos o exógenos, mediante técnicas in situ o ex situ, en condiciones aerobias o anaerobias (1) (8).

La tecnología in situ, constituye la aplicación del proceso de biorremediación del suelo contaminado en su propio lugar, tratando extensiones grandes de suelo con un mínimo de transporte. La tecnología ex situ incluye procesos en fase de lodos y en fase sólida, dentro de esta última se encuentra el compostaje y el landfarming. Son técnicas más costosas que las in situ, ya que requieren de excavación y del acondicionamiento del suelo a tratarse, pero permiten controlar de mejor forma las variables ambientales. Ambas técnicas buscan estimular y crear un ambiente favorable para el crecimiento microbiano a partir de los contaminantes, con la adición de humedad, de nutrientes (bioestimulación), oxígeno y organismos (bioaumentación) (1) (4) (8).

### **1.4.1. LANDFARMING**

El landfarming o tratamiento superficial en tierra, es una técnica de remediación ex situ, aerobia, cuya aplicación usual es la reducción de la concentración de TPH en suelos contaminados (20).

Los suelos contaminados son excavados y tratados en espacios abiertos, sobre la superficie revestida con geomembrana para evitar toda posibilidad de percolación de lixiviados. El drenaje

se recolecta mediante tuberías perforadas y se tratar por separado o se recircula. La eficacia del tratamiento es menor a medida que se incrementa el peso molecular de los contaminantes a ser degradados (4) (8).

#### **1.4.1.1. PARÁMETROS DE CONTROL**

La efectividad del tratamiento mediante landfarming depende de las características del suelo, de los constituyentes y de las condiciones climáticas (20).

Dentro de las características del suelo se encuentran:

##### ***a) Densidad de la población microbiológica***

La concentración óptima en el recuento de microorganismos heterótrofos totales es de  $10^8$  UFC/g de suelo (10).

##### ***b) El pH***

El rango para el crecimiento microbiano se encuentra entre 6 a 8 siendo el óptimo de 7, fuera de estos rangos debe ser ajustado. Cuando el pH excede 8 se debe disminuir el mismo mediante adición de azufre al suelo. Si es menor de 6 se puede incrementar mediante la incorporación de carbonato de calcio o hidróxido de calcio al suelo (3) (4).

##### ***c) Humedad***

La humedad del suelo influye en la actividad biológica de los microorganismos y por ende en su desarrollo, al actuar como medio de transporte de nutrientes y oxígeno a la célula. El rango de

efectividad en el que debe estar la humedad del suelo para aplicar la técnica de landfarming es de 40 a 85 % de la capacidad de campo (2) (4) (10).

Si hay un exceso de humedad, existen restricciones en el movimiento del aire, lo que reduce la viabilidad del oxígeno e inhibe el proceso por anaerobiosis, este problema se presenta cuando existe precipitaciones elevadas o un drenaje pobre. En el caso contrario que el suelo se encuentra reseco como resultado de los procesos de evaporación, incrementados en las operaciones de aireación, es necesario aumentar la humedad con la irrigación de agua (20).

#### **d) *Temperatura del suelo***

La temperatura influye en la velocidad de degradación marcadamente, La actividad metabólica de la mayoría de microorganismos degradadores de hidrocarburos se encuentra en un rango de 10 a 45 °C, siendo su valor óptimo en un rango de 25 a 35 °C, por encima de estos disminuye su actividad (4) (20).

#### **e) *Nutrientes***

Los nutrientes y aceptores de electrones son necesarios para mantener el crecimiento de la biomasa y la generación de energía. El rango típico de la relación C/N/P/K necesaria para la biodegradación de los hidrocarburos es de 100:10:1:1, dependiendo de los constituyentes específicos y los microorganismos que involucre el proceso de biodegradación. Se ha demostrado en pruebas de laboratorio que en concentraciones mayores de N y P se trabaja de mejor forma para degradar residuos (4) (11) (20).

Dentro de las características de los constituyentes tenemos:

**a) *Propiedades químicas***

Dentro de las cuales las de mayor importancia son su volatilidad y su estructura química (20).

**b) *Concentración y toxicidad***

En general una concentración de TPH en un rango de 10.000 a 50.000 mg/Kg y presencia de metales pesados excediendo los 2.500 mg/Kg son inhibidores del crecimiento y reproducción y/o tóxicos para la mayoría de microorganismos (20).

**c) *Biodisponibilidad***

Es la disponibilidad de los contaminantes a ser degradados, la tasa de degradación de los hidrocarburos depende tanto de la capacidad de transporte y del metabolismo microbiano, como de la transferencia de masa del compuesto (20).

Dentro de las condiciones climáticas tenemos:

**a) *Temperatura del ambiente***

La temperatura ambiental actúa directamente sobre la temperatura del suelo impactando la actividad microbiológica y consecuentemente la biodegradación (20).

**b) *Precipitación***

Es un factor que incrementa la humedad del suelo, y causa erosión, es por ello la necesidad de utilizar impermeabilización y un sistema de recolección de lixiviados (20).

**c) Viento**

Es un parámetro que causa erosión del suelo, concretamente en las operaciones de labrado, efecto que puede ser limitado al incrementar la humedad y efectuar el arado en hileras (20).

**1.4.2. BIOESTIMULACIÓN**

La bioestimulación es la activación de los microorganismos autóctonos degradadores de hidrocarburos, mediante la adición de nutrientes y aceptores de electrones al entorno contaminado de acuerdo a sus deficiencias, conforme a la relación C/N/P/K 100/10/1/1, para acelerar la tasa de biodegradación (11) (10) (20).

Los microorganismos pueden disponer con facilidad de una parte pequeña de los nutrientes existentes en la fracción mineral del suelo con la dificultad de ser un proceso muy lento. Los nutrientes son necesarios para el desarrollo y crecimiento de los microorganismos principalmente los macronutrientes (C, N, P, K) y en menor cantidad los micronutrientes (4).

Los hidrocarburos en el suelo aumentan la cantidad de C disponible en el medio para la actividad metabólica de los microorganismos, si esto ocurre en lugares donde la concentración de nutrientes inorgánicos como N y P es baja, produce relaciones C/N y C/P muy altas, de tal forma que su concentración es un factor limitante en la degradación microbiana de hidrocarburos, se puede ajustar la proporción C/N/P mediante la adición al medio de fertilizantes inorgánicos como la Urea- fosfato, N-P-K, y sales de amonio y fosfato y sales de potasio. También se pueden utilizar fertilizantes de origen orgánico como estiércol, de esta manera se puede acelerar el proceso de biodegradación (26) (31).

La urea es un fertilizante nitrogenado inorgánico sólido, el ácido carbónico de la diamida, cuya fórmula química es  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ , el aporte de nitrógeno de la urea es del 46 % P/P. Su aplicación suele provocar acidificación, que puede ser contrarrestada con la aplicación de cal (3).

El Sulfato potásico es una sal utilizada como fertilizante que contiene 50 % P/P ( $\text{K}_2\text{O}$ ). Tienen escaso o ningún efecto sobre el pH del suelo (3).

### **1.4.3. BIOAUMENTACIÓN**

Generalmente, en un suelo con contaminación recurrente o con episodios previos de contaminación, las poblaciones nativas se habrán seleccionado a favor de la metabolización del contaminante, a pesar de ello, sus cantidades pueden resultar demasiado pequeñas para llevar a cabo la rápida degradación, por lo que es necesario incrementar su número, proceso conocido como Bioaumentación (1) (23) (31).

La degradación de los hidrocarburos se favorece por una población variada de microorganismos con amplia capacidad enzimática, generalmente en consorcios, que consiste en una agrupación que vive interactuando entre sí positivamente y que lleva a cabo más eficientemente la degradación (1) (4).

La aplicación de un consorcio de bacterias degradativas de hidrocarburos permite la conversión a ácidos grasos, agua,  $\text{CO}_2$  y biomasa, los cuales son inofensivos para el medio ambiente, disminuyendo su población después de que los hidrocarburos han disminuido ya que se agota la fuente de carbono (4) (23).

#### **1.4.3.1 Microorganismos implicados**

Dentro de los microorganismos más empleados en la biodegradación de hidrocarburos se encuentran las bacterias, los géneros más comunes son: Aeromona, Bacillus, Brevibacillus, Brevibacterium, Burkholderia, Chromobacterium, Pseudomonas, Stenotrophomonas, Vibrio, Flavobacterium (10).

#### **1.4.3.2 Biodegradación de los hidrocarburos**

Al conjunto de caminos metabólicos por medio de los cuales los tejidos incrementan la polaridad de un tóxico se le denomina biotransformación. En algunos casos, la biotransformación resulta en la producción de un metabolito que es más tóxico que el compuesto original, al proceso se le denomina bioactivación. Si estos metabolitos se acumulan y vencen las defensas del organismo entonces pueden producir un daño que se manifieste en una respuesta tóxica (1).

Los hidrocarburos son biodegradables en forma aerobia, sin embargo la tasa de biodegradación depende de la complejidad de la molécula, algunos hidrocarburos aromáticos pueden ser degradados en condiciones anaerobias. Cuando la fuente de carbono es un hidrocarburo, los microorganismos facilitan su difusión hacia la célula produciendo sustancias como carbohidratos, ácidos grasos, enzimas y biosurfactantes (4) (11).

Los alcanos lineales son los hidrocarburos más biodegradables, a pesar de eso los alcanos con números de carbono entre C5 y C6 son solventes que pueden romper la membrana lipídica de las bacterias, los hidrocarburos con C20 a C40 son cada vez más apolares por tanto insolubles en agua. La degradación se inicia con la acción de enzima mooxigenasa en un proceso

reversible en el que el hidrocarburo pasa a alcohol, este es fuertemente oxidado a aldehído y luego a su ácido graso luego se da una  $\beta$ -oxidación (4).

Los cicloalcanos son menos degradables que los isómeros de cadena lineal, pero más degradables que los HAPs, son más fácilmente degradados los cicloalcanos con cadenas largas o con un grupo alquilo que uno no sustituido. Los cicloalcanos son degradados mediante el ataque de oxidasas dando un alcohol cíclico el cual es deshidrogenado a una cetona, luego sufre un ataque en el grupo alquilo y se transforma en un ácido graso (8).

Los compuestos aromáticos más simples como los BTEX (benceno, xileno, etilbenceno, tolueno) son compuestos solubles en agua. La degradación de las moléculas aromáticas involucra dos etapas activación del anillo y rotura del anillo; la activación involucra la incorporación del oxígeno molecular dentro del anillo, con la ayuda de enzimas oxigenasa, la monooxigenasa que se encuentran en hongos y eucariotas, catalizan la incorporación de un solo átomo de oxígeno para formar un grupo epóxido, a continuación las dioxigenasas, características de las bacterias, catalizan la incorporación de dos átomos de oxígeno molecular, al mismo tiempo para formar un dihidrodiol, luego estos son oxidados a derivados dihidroxilados tales como el catecol, los cuales son precursores para romper el anillo. Los HAPs son hidrocarburos formados por dos o más anillos de benceno, en general un aumento del peso molecular y el número de anillos en su estructura, producen un decremento de la solubilidad y volatilidad, estos hidrocarburos se degradan anillo por anillo, los HAPs de alto peso molecular resisten a la degradación microbiana mientras que los de bajo peso molecular no se encuentran (8).

Los asfaltos y resinas son compuestos de alto peso molecular, con estructuras complejas compuestas de cadenas de hidrocarburos, nitrógeno, azufre, oxígeno ligados a ramificaciones

policíclicas aromáticas las cuales incluyen níquel y vanadio. Estos compuestos son recalcitrantes debido a su insolubilidad y resistencia a la degradación, ésta última junto con su formación por medio de reacciones de condensación los tornan acumulables en el transcurso del tiempo (8).

## 1.5 SUSTRATO

Un sustrato es todo material sólido distinto del suelo, natural, de síntesis o residual, mineral u orgánico, en forma pura o en mezcla, que interviene en el complejo proceso de nutrición mineral del suelo (24).

### 1.5.1. CLASIFICACIÓN

Existen diferentes criterios de clasificación de los sustratos, basados en el origen de los materiales, su naturaleza, sus propiedades y su capacidad de degradación (24).

De acuerdo al origen del material empleado en su elaboración, se clasifican en:

**Sustratos inorgánicos.-** son sustratos preparados a partir de rocas, minerales y residuos industriales, no son biodegradables (ejm: arena, grava, ceniza volcánica, vermiculita etc...) (24).

**Sustratos orgánicos.-** son sustratos que pueden ser de origen natural (ejm; la turba), provenientes de la síntesis química y los de subproductos y residuos agroindustriales y urbanos, usados luego de ser sometidos a un proceso de compostaje (24).

## **1.5.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUSTRATOS ORGÁNICOS**

Al ser interés de esta investigación la aplicación de dos sustratos orgánicos en forma de abono, enunciaremos algunas de sus características físicas, químicas y microbiológicas, las cuales varían en función del material empleado en su elaboración y por otro lado al tratarse de un producto orgánico no tiene composición química constante, entre ellas se encuentran (24):

### **1.5.2.1. Porosidad**

Es el volumen total del medio no ocupado por las partículas sólidas, y por tanto, lo estará por aire o agua en una cierta proporción. Su valor óptimo no debería ser inferior del 80 a 85 % (24).

### **1.5.2.2. Densidad**

El valor óptimo de densidad aparente de un sustrato es menor a 0,4 g/mL pero puede variar de 0,1 a 0,7 g/mL y para la densidad real sus valores se encuentran entre 1,45 y 2,65 g/mL (24) (30).

### **1.5.2.3. El pH**

Según sea su valor estarán disponibles en mayor o menor medida los iones de los minerales que contiene. Por estos motivos el pH de un sustrato debe estar alrededor de 6,5 – 7,5 ya que este es al parecer el rango de máxima disponibilidad de nutrientes (24).

### **1.5.2.4. Nutrientes**

Un sustrato ideal debe tener nutrientes esenciales: (N, K, P, S, Ca, Mg) entre los macroelementos y Cu, Zn, Fe, Na, Mn, B, Cl, Mo entre los microelementos (24).

#### **1.5.2.5. Materia Orgánica**

Los valores de materia orgánica deben estar entre 20 al 40 % (30).

#### **1.5.2.6. Microorganismos**

Al tratarse de materia orgánica degradada contiene una gran diversidad de microorganismos, poblaciones de las que depende la velocidad de descomposición de la materia orgánica, la generación de productos de descomposición y la actividad reguladora de crecimiento (24).

### **1.5.3. BENEFICIOS QUE EJERCEN LOS SUSTRATOS ORGÁNICOS SOBRE EL SUELO**

Un sustrato orgánico cumple un rol trascendental al corregir y mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos, tales como:

#### **1.5.3.1. En las propiedades Físicas**

Los abonos orgánicos influyen en las siguientes propiedades físicas del suelo (13).

- a) Estructuración del suelo, contribuyendo a su estabilidad.
- b) Aumenta la penetración del agua y la capacidad de retención de humedad.
- c) Mejora la porosidad, facilitando la aireación, aumentando la infiltración y permeabilidad del suelo.
- d) Forma agregados con las arcillas, que junto con la capacidad de retención de agua, lo hace un buen agente preventivo de la erosión.

### **1.5.3.2. En las propiedades químicas**

Los sustratos orgánicos influyen en las siguientes propiedades químicas:

- a) Aumenta la capacidad tampón de los suelos (2) (24).
- b) Al presentar una gran capacidad de intercambio catiónico aportar con iones de carga negativa de tamaño coloidal capaces de retener e intercambiar cationes nutritivos (13).
- c) Acrecienta el intercambio de aniones, especialmente de fosfatos y sulfatos (2).
- d) Suministra una fuente de carbono y energía para los microorganismos (13).
- e) Aumenta la disponibilidad de nutrientes, pero en forma lenta en relación a los fertilizantes inorgánicos (13).

### **1.5.3.3. En las propiedades biológicas**

- a) Estimulación de la actividad biológica del suelo (24).
- b) Aporte de microorganismos al suelo (24).

### **1.5.4. COMPOST**

El compost es un abono orgánico proveniente de la descomposición de residuos de origen animal, vegetal y agroindustrial, mediante un proceso de digestión aeróbica conocido como compostaje, en condiciones controladas, llevada a cabo por los microorganismos, que liberan energía, agua, anhídrido carbónico y sales minerales (13) (17).

Existen distintos sistemas de compostaje se agrupan en dos grandes clases: cerrados o en reactores y abiertos o compostaje en pilas. El compostaje en sistemas abiertos se subdividen en: pilas estáticas, pilas dinámicas pilas estáticas aireadas en forma pasiva y forzadamente (17).

Actúan diferentes organismos según las condiciones que se presentan, los macroorganismos (insectos, gusanos, etc.) rompen las moléculas de mayor tamaño para que los microorganismos (bacterias, hongos, actomicetes) tengan una mayor superficie de contacto, degradando complejas proteínas y carbohidratos a aminoácidos y azúcares simples (13) (17).

Las características químicas del compost dependen de la cantidad y tipo de materiales utilizados como de las condiciones ambientales que se dieron durante el proceso de descomposición (13).

En la etapa final se obtiene el compost que está constituido por materia orgánica estabilizada, humus, minerales, agua y microorganismos, el material es homogéneo, de olor similar al de la tierra y su temperatura igual a la de sus alrededores (17).

#### **1.5.5. BOCASHI**

Término japonés que significa abono orgánico fermentado, es un biofertilizante que proviene del proceso de descomposición aeróbica y termofílica de residuos orgánicos, gracias a la acción de microorganismos quimiorganotróficos, que en condiciones favorables producen un material parcialmente estable de lenta descomposición, que se incorporan al suelo sin terminar el proceso en sí, lo cual permite aportar al suelo nutrientes y poblaciones de microorganismos en crecimiento y desarrollo (18) (21) (28).

La tecnología del bocashi puede evitar las desventajas del compost, tales como formación de gases tóxicos, el difícil manejo de volumen, la sobrevivencia de agentes fitopatógenos y el largo tiempo de preparación (21) (28).

El principal objetivo del bocashi es activar y aumentar la población de microorganismos benéficos en el suelo para lo cual se dispone de diversos materiales y un método de fabricación que posibilita cumplir con esta meta (7).

El procedimiento de forma general consiste en colocar cada uno de los materiales en capas tipo pastel, añadir la melaza y la levadura disuelta en agua, luego mezclar todos los materiales, controlar la humedad y extender en el piso de tal forma que la altura del montón no sobrepasa los 60 cm (14) (19).

Realizar el control de la temperatura, por lo general, en los primeros días de fermentación tiende a subir a más de 80 °C, para evitar esto se recomienda hacer dos a tres volteos diarios, uno por la mañana y otra por la tarde, lo que permite dar aireación y el enfriamiento del abono. La temperatura de fermentación debe estar dentro de los 50 °C. La estabilidad de la temperatura se logra del quinto al octavo día. Después se recomienda dar un volteo al día (28).

El abono orgánico fermentado logra su maduración del décimo al quinceavo día, en este momento la temperatura del abono es igual a la del ambiente, su color es gris claro, seco, con un aspecto de polvo arenoso y de consistencia suelta (14).

El abono debe ser elaborado en lugar protegido de la lluvia y del sol, el local ideal es una galera con piso ladrillo o revestido con cemento, por lo menos sobre el piso de tierra bien firme, de modo que se evite la pérdida o acumulación indeseada de humedad donde se fabrica (28).

Las herramientas necesarias son: palas, baldes plásticos, regadera o bomba en mochila para la distribución uniforme de la solución de melaza y levadura en el agua, manguera para el agua, mascarilla de protección contra el polvo y botas de hule (28).

Los puntos críticos en la fabricación del bocashi son mantener el contenido de agua y la temperatura de fermentación de sus ingredientes. Si el material está demasiado húmedo el calor de fermentación es bajo generando una fermentación anaeróbica o un "bocashi putrefacto". Cuando el material está seco la fermentación procede demasiado rápido produciendo excesivo calor dando como resultado un "bocashi quemado", que es de calidad inferior, ya que ha perdido su nitrógeno en el aire y tiene pocos microorganismos (21).

#### **1.5.6. MATERIALES UTILIZADOS EN SU ELABORACIÓN**

La composición de los abonos orgánicos varía considerablemente depende de los materiales y las condiciones del lugar en el que se realiza, generalmente se utiliza las siguientes fuentes (13):

##### **a) Fuente de carbono**

Lo constituyen los rastrojos secos como el aserrín de madera, zarzales (ramas, hojas, arbustos), caña de maíz, malezas secas, paja de cereales, desecho de cocina, cascarilla de arroz, tamo de café, estopa de coco, fibra de palma africana.

##### **b) Fuente de nitrógeno**

Lo constituyen los rastrojos verdes, leguminosas, estiércol, sangre.

##### **c) Fuente de materia mineral**

Cal inorgánica, roca fosfórica, ceniza vegetal, tierra común, agua.

### **1.5.7. FACTORES QUE INFLUYEN EN SU PRODUCCIÓN**

Al ser un proceso biológico, llevado a cabo por microorganismos, se ve afectado por los factores que perturban su desarrollo, entre los que cabe citar:

#### **1.5.7.1. Temperatura**

La temperatura es el factor determinante de las poblaciones microbianas y según la cual el compostaje se divide en diferentes etapas: la etapa mesofílica.- es una etapa con temperaturas de 15 a 45 °C, los microorganismos actúan sobre los compuestos solubles y de fácil degradación. Dura de dos a tres días. Inicialmente los residuos se encuentran a temperatura ambiente, los microorganismos crecen y la temperatura sube; la etapa termofílica.- es una etapa con temperaturas mayores a los 40 °C, este proceso durará desde algunas semanas hasta 2 o 3 meses y la etapa de estabilización que es la etapa de maduración, se encuentra marcada por una baja tasa de actividad microbiana, la temperatura decrece casi se iguala con la del ambiente. (10) (21).

En el proceso de elaboración del Bocashi hay dos etapas bien definidas: La primera etapa es la fermentación de los componentes del abono, cuando la temperatura puede alcanzar hasta 70 a 80 °C por el incremento de la actividad microbiana, posteriormente, la temperatura del abono empieza a bajar por agotamiento o disminución de la fuente energética. La segunda etapa corresponde al proceso de estabilización y solamente sobresalen los materiales que presentan mayor dificultad para degradarse a corto plazo para luego llegar a su estado ideal para su inmediata utilización (28).

### **1.5.7.2. pH**

El pH influye sobre el proceso de compostaje, debido, a su acción sobre la actividad de los microorganismos. Este parámetro importante sirve para evaluar el ambiente microbiano y la estabilización de los residuos (17).

Durante el proceso de compostaje se producen varios procesos que hacen variar este parámetro. Al comienzo como consecuencia del metabolismo bacteriano, los complejos carbonatos degradables, se transforman en ácidos orgánicos, provocando que el pH descienda. Conforme el proceso de compostaje continúa los ácidos orgánicos son descompuestos liberándose bases de Ca y Mg y altos contenidos de  $\text{NH}_3$  que ayudan a elevar el pH, alcanzando valores más altos como 8,5 lo cual coincide con el máximo de la actividad microbiana en fase termófila. Finalmente el pH disminuye en la fase final de maduración valores entre 7 y 8 (17).

### **1.5.7.3. Humedad**

Los microorganismos requieren una cierta cantidad de agua para su metabolismo por lo tanto este es un factor que incide en la velocidad de la descomposición de la materia orgánica (17).

Al tratarse de procesos aeróbicos un bajo contenido de humedad priva a los microorganismos del agua necesaria para su metabolismo y una humedad demasiado elevada puede generar condiciones anaerobias, al ocupar el agua todos los poros y no dejar espacio para el aire (17).

La humedad óptima para la elaboración de abonos orgánicos se encuentra entre 50 a 60 % (21).

Su control es mediante la prueba de puño, que consiste en tomar un poco de material con la mano y apretarlo; si escurre un poco de agua entre los dedos, está en buen punto de humedad;

si la masa está demasiado seca, se desmorona al abrir la mano; en este caso hay que humedecerla (21) (19).

#### **1.5.7.4. Aireación**

Para llevar a cabo el proceso de degradación aerobia es indispensable la presencia de la cantidad necesaria de oxígeno, de lo contrario, los microorganismos aerobios son sustituidos por los anaerobios (17).

La aireación tiene varios objetivos: mezclar los materiales, evitar la compactación, creación de nuevas superficies de ataque para los microorganismos, aportar el oxígeno suficiente a los microorganismos y permitir al máximo la evacuación del dióxido de carbono producido (17).

#### **1.5.7.5. Relación Carbono: Nitrógeno (C/N)**

De los muchos elementos requeridos para la descomposición microbiana, el carbono y el nitrógeno son los más importantes (2).

Cuanto más elevada sea la relación C/N de los residuos vegetales más prolongado es el proceso de descomposición. Para hacer compost se requiere una mezcla que promedie una relación C/N de 30:1 en peso y para el Bocashi de 25:1 en peso. A medida que el compostaje avanza, el cociente C/N disminuye gradualmente llegando a alcanzar valores entre 8 y 15 en el producto final "compost", esto ocurre ya que gran parte del carbono es continuamente liberado ( $\text{CO}_2$ ), mientras que la mayoría del nitrógeno es reciclado, lo que refleja la descomposición de la materia orgánica y su estabilización (2) (13).

#### **1.5.7.6. La homogeneidad de los materiales**

Cuanto más homogéneo sea el tamaño de las partículas de los materiales que se utilizan en los abonos, mejor será la calidad del producto final. El tiempo para que el abono esté listo se puede reducir con ello de unos ocho a diez días. Para mejorar la homogeneidad de algunos materiales, estos se pueden triturar o picar en forma mecánica o manual en tamaños de 5 cm (28).

# CAPÍTULO II

## **CAPÍTULO II**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 ELABORACIÓN DE SUSTRATOS**

##### **2.1.1. UBICACIÓN**

El bocashi fue elaborado dentro de las instalaciones del PEPDA-SACHA, que se encuentra en el campamento SACHA-CENTRAL del campo SACHA de PETROECUADOR, en las siguientes coordenadas referenciales 9963421,6 N 291134,8 E a 285 m.s.n.m, con una superficie de 72 m<sup>2</sup>.

El espacio destinado para el proceso de compostaje se encuentra ubicado dentro del área de abonos del PEPDA-SACHA, en las coordenadas referenciales 9963465,2 N, 291096,5 E a 284 m.s.n.m, ocupando una extensión de terreno de 810 m<sup>2</sup>.

##### **2.1.2. MATERIALES**

Los materiales empleados para la elaboración de sustratos fueron productos secundarios obtenidos de procesos productivos, realizados en los poblados que se encuentran en los alrededores del Campo Sacha. A continuación se describen sus características:

- La fibra de palma africana es un producto secundario de la producción de palma africana, que contiene un alto contenido de proteínas y grasas (28).

- La cascarilla de arroz es el subproducto del pilado del arroz, utilizada para mejorar las características físicas del abono orgánico, facilita la aireación, absorción de la humedad y de la filtración de nutrientes. Es una fuente rica en sílice y puede ser aplicada como ceniza, la misma que aporta con nutrientes como el P y K y al mismo tiempo ayuda a corregir la acidez (29).
- El tamo de café proviene del despulpado del café es una fuente de carbono (2).
- El Aserrín proviene de los aserraderos de Sacha.
- El bagazo de la caña de azúcar es el residuo de la molienda de la caña de azúcar (2).
- El Estiércol de animales constituye sus excrementos, provienen de las haciendas ganaderas y las avícolas de la zona. El estiércol es la principal fuente de nutrientes como N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, y B; incrementa la retención de humedad y mejora la actividad biológica (13).
- Las leguminosas utilizadas son perennes con un alto contenido de nitrógeno, entre ellas está la flemigia (*Flemigia macrophila*) y canavalia (*Cannavalia ensiformis*) utilizadas para la elaboración de abonos verdes y por el PEPDA en la séptima etapa para la eliminación de piscinas (2).
- Los vegetales tiernos aportan con nitrógeno, provienen de los desbroces operación comúnmente realizada para la limpieza de los alrededores de los campamentos.
- El Compost es el medio para iniciar el desarrollo de la actividad microbiológica del abono, también tiene la función de dar una mayor homogeneidad física al abono y distribuir su humedad, puede sustituirse por suelo o turba (29).

- El Carbón fue obtenido de la zona comercial del Sacha, este mejora las características físicas del suelo en cuanto a aireación, absorción de humedad y calor. Su alto grado de porosidad beneficia la actividad macro y microbiológica del suelo; al mismo tiempo funciona como esponja, con la capacidad de retener, filtrar y liberar gradualmente nutrientes, disminuyendo la pérdida por el lavado de los mismos (28) (29).
- La levadura es un hongo microscópico capaz de fermentar los hidratos de carbono, mediante un proceso aerobio, corresponde a la fuente de inoculación. Fue obtenida en la zona comercial del Sacha (28).
- La melaza es un subproducto de la producción de azúcar, es la principal fuente de energía de los microorganismos que participan en la fermentación del bocashi (29).
- El agua crea las condiciones favorables para el desarrollo de la actividad y reproducción microbiológica, ayuda a homogeneizar la humedad de todos los ingredientes que componen el abono (29).
- Cal inorgánica es utilizada para controlar la acidez de los abonos (2).

## **2.2 ENSAYO EXPERIMENTAL DE BIORREMEDIACIÓN**

### **2.2.1. UBICACIÓN**

El ensayo experimental de biorremediación se llevo a cabo en una superficie de terreno de 120m<sup>2</sup>, localizado en las coordenadas referenciales 291095 E y 9963442 N a 279 m.s.n.m, dentro de las instalaciones del PEPDA-SACHA.

## **2.2.2. MATERIALES**

### **2.2.2.1 Sustratos**

- El compost es elaborado por el Área de Abonos del PEPDA-SACHA, a partir de materia orgánica, actualmente utilizado en la séptima etapa del proceso de remediación de las piscinas contaminadas con hidrocarburos, que corresponde a la revegetación del área afectada. Fotografía N° 1 del anexo D
- El bocashi fue elaborado utilizando materia orgánica obtenida de las poblaciones que existen en los alrededores del PEPDA-SACHA. Fotografía N° 2 del anexo D

### **2.2.2.2 Suelo contaminado con hidrocarburos**

El suelo utilizado en el ensayo experimental es procedente de las piscinas SACHA 24-2, 44, 50-3, 72-2, 77, 111, el mismo que ha sido sometido a un proceso de lavado in-situ con productos químicos (surfactantes), luego extraído, transportado y acumulado para su posterior tratamiento biológico mediante landfarming en lechos o en plataformas, formando un montículo ubicado en las coordenadas referenciales 291146 E 9963408 N a una altitud de 283 m.s.n.m, en el proyecto PEPDA-SACHA. Dicho suelo se encontraba altamente compactado, a la intemperie y sometido directamente a las condiciones ambientales de la zona. Fotografía N° 3 del anexo D

## **2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **2.3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN**

- Por el nivel de profundidad: explicativa.
- Por la secuencia de estudio: transversal.
- Por el tipo de datos a analizar: cuantitativa.
- Por las condiciones de estudio: de laboratorio y campo.
- Por la utilización del conocimiento: aplicada.
- Por la rigurosidad del método empleado: es un diseño experimental axb.

### **2.3.2 METODOLOGÍA**

El ensayo experimental se lo ejecutó en PEPDA con un período de duración de 6 meses, el período de biorremediación fue de cuatro meses y medio. Se realizó el estudio de aplicación de dos sustratos orgánicos (compost y bocashi) en la técnica de landfarming para el tratamiento de suelo contaminado con hidrocarburos, variando la concentración de los sustratos en 10 %, 20 % y 30 % (V/V), además se evaluó un tratamiento testigo que no fue sometido a procedimiento alguno, de tal manera que se aplicaron siete tratamientos, cada uno con tres repeticiones, obteniéndose 21 unidades experimentales.

Es un diseño Factorial axb, al evaluarse el efecto combinado de dos factores o variables sobre una variable respuesta. Los factores fueron el tipo y concentración de sustrato y las variables respuesta fueron los parámetros de estudio de descontaminación del suelo, establecidos en la tabla 6 del RAOH, Decreto 1215.

El análisis estadístico se lo realizó con la ayuda del programa MSTAT, se efectuó el análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de Tukey, para seleccionar el sustrato más efectivo para el proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

### 2.3.3 PLAN DE TABULACIÓN

#### 2.3.3.1 FACTORES DE ESTUDIO

**Factor A:** Tipo de sustrato

**a1** = Sustrato A (Compost).

**a2** = Sustrato B (Bocashi).

**Factor B:** Concentración de los sustratos

**b1** = concentración 30 % (V/V).

**b2** = concentración 20 % (V/V).

**b3** = concentración 10 % (V/V).

#### 2.3.3.2 VARIABLES RESPUESTA

- Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH).
- Metales pesados (Ni, Cd, Pb).

#### 2.3.3.3 HIPÓTESIS

<b>HIPÓTESIS NULA</b>	<b>Ho:</b>	$A_i = 0$	$B_j = 0$	$AB_{ij} = 0$
<b>HIPÓTESIS ALTERNATIVA</b>	<b>H1:</b>	$A_i \neq 0$	$B_j \neq 0$	$AB_{ij} \neq 0$

### 2.3.4 TRATAMIENTOS EN ESTUDIO

Se aplicó siete tratamientos con tres repeticiones obteniéndose 21 unidades experimentales:

FACTOR A	FACTOR B	RÉPLICAS	COMBINACIÓN DE TRATAMIENTOS		
a1: Compost	b1: (30 %)	r1, r2, r3	a1b1r1	a1b1r2	a1b1r3
	b2: (20 %)	r1, r2, r3	a1b2r1	a1b2r2	a1b2r3
	b3: (10 %)	r1, r2, r3	a1b3r1	a1b3r2	a1b3r3
a2: Bocashi	b1: (30 %)	r1, r2, r3	a2b1r1	a2b1r2	a2b1r3
	b2: (20 %)	r1, r2, r3	a2b2r1	a2b2r2	a2b2r3
	b3: (10 %)	r1, r2, r3	a2b3r1	a2b3r2	a2b3r3
T	----	r1, r2, r3	T1	T2	T3

Arreglo aleatorio de las unidades experimentales en el ensayo experimental.

a2b2r2	T3	a2b1r3
a1b2r2	a2b1r1	a1b1r3
a2b3r3	a2b2r3	a2b3r1
a2b3r2	a1b1r2	T2
T1	a1b2r3	a1b3r1
a1b1r1	a1b3r2	a2b1r2
a2b2r1	a1b3r3	a1b2r1

### 2.4 RENDIMIENTO DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

$$\% \text{ RENDIMIENTO} = ((C.\text{INICIAL} - C.\text{FINAL})/C.\text{INICIAL}) * 100$$

*Ecuación N° 1*

## **2.5 MUESTREO**

### **2.5.1. MATERIALES**

- Barreno
- Espátula
- Fundas de cierre hermético (ziploc)
- Frascos estériles
- Guantes de examinación
- Marcador de tinta indeleble
- Cooler

### **2.5.2. MUESTREO DE SUSTRATOS**

El muestreo utilizado para la recolección de las muestras de sustratos fue aleatorio. La finalidad con la que se realizó fue la caracterización de los mismos.

El tipo de muestra recolectada es compuesta, conformada por 20 muestras simples recogidas de posiciones distribuidas al azar en forma de zigzag, homogenizadas para obtener una muestra compuesta de 1 kg.

La recolección de la muestras fue en funda de cierre hermético (ziploc) para el análisis físico químico y en frascos estériles para realizar el recuento heterótrofo en placa.

Las muestras fueron transportadas hacia el laboratorio en cadena de frío para realizar los respectivos análisis.

### **2.5.3. MUESTREO DE SUELO**

El muestreo del suelo contaminado con hidrocarburos es representativo para que los resultados sean extrapolables a todo el suelo contaminado representado. Se empleo el muestreo aleatorio.

El objetivo del muestreo de suelo es la caracterización inicial y el monitoreo de las variables respuestas de descontaminación, durante el ensayo experimental de biorremediación.

Del suelo seleccionado del montículo para el desarrollo de esta investigación, una vez pretratado, se realizó el muestreo aleatorio para la caracterización inicial, recolectándose una muestra compuesta de 20 muestras simples, distribuidas al azar en forma de zigzag.

Durante el desarrollo del proceso de biorremediación se realizó cuatro muestreos aleatorios, recolectando una muestra compuesta de cada unidad experimental, conformada por 5 muestras simples recolectadas de posiciones distribuidas al azar en forma de zeta. Fotografía N° 17 del anexo D.

La recolección de la muestra fue en fundas de cierre hermético (ziploc) para el análisis físico químico y en frascos estériles para el recuento heterótrofo en placa.

El transporte de las muestras al laboratorio se realizo en cadena de frío.

## **2.6 MONITOREO**

Se llevo a cabo el monitoreo del suelo en el proceso de biorremediación con el objetivo de controlar las variables respuesta de descontaminación del suelo.

En la caracterización inicial de los sustratos y del suelo se determinó parámetros físico-químicos como la densidad aparente y real, porosidad, pH, MO, COT, macro y micronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, Zn, Fe, Cu, Mn). El parámetro microbiológico fue recuento heterótrofo en placa (RHP). Adicionalmente para la caracterización del suelo contaminado se determinó la textura, capacidad de campo y parámetros de contaminación como TPH y metales pesados. Sus resultados se encuentran en el Cuadro N° 4 y 5.

Durante el proceso de biorremediación se determinó los parámetros de estudio establecidos en la Tabla 6 del Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas del Ecuador, decreto 1215, (TPH, metales pesados, exceptuando HAPs), además los parámetros de control como la población de heterótrofos totales (RHP), el pH, la temperatura del suelo, la humedad, temperatura y humedad ambiental.

Los análisis físicos químicos y microbiológicos fueron realizados en las instalaciones del Laboratorio de Protección Ambiental LABPAM perteneciente a PETROECUADOR y en Laboratorio de Ciencias Biotecnológicas LACIB- PEPDA.

### 2.6.1. MÉTODOS

**Tabla III.** *Métodos utilizados para la determinación de parámetros físico químicos y RHP.*

PARÁMETRO	MÉTODO
Humedad	Determinación directa con la prueba de puño.
Textura	Determinación gravimétrica
Densidad real	Determinación gravimétrica
Densidad aparente	Determinación gravimétrica

**(Continuación)** Métodos utilizados para la determinación de parámetros físico químicos y RHP

PARÁMETRO	MÉTODO	REFERENCIA
Porosidad	Relación entre la densidad aparente y la densidad real	
Materia Orgánica.	Determinación gravimétrica	
Carbono Orgánico Total.	Determinación gravimétrica	
Temperatura	Determinación directa con termómetro de Campo.	
Potencial hidrógeno	Extracción de la muestra de suelo y sustrato. Determinación potenciométrica, utilizando un electrodo de vidrio.	EPA. Standard Method N° 9045D
Nitrógeno	Digestión ácida, mediante el método kjeldhal. Determinación volumétrica.	Standard Method APHA 4500.N. C
Fósforo	Determinación colorimétrica en el espectrofotómetro a luz visible.	Standard Method APHA 4500 P. C
Potasio	Determinación con espectroscopía de absorción atómica en el equipo de absorción atómica.	Standard Method APHA 3111B (1989)
Calcio, Zinc, Magnesio, Hierro, Cobre, Manganeso.	Determinación con espectroscopía de absorción atómica en el equipo de absorción atómica.	Standard Method APHA 3030 B y 3111B (1989) EPA 3050B (1996)
Hidrocarburos Totales (TPH)	Extracción con S-316, determinación por espectrofotometría infrarrojo.	EPA 413.1 (1996)
Cadmio	Digestión ácida de la muestra y	EPA 3050B (1996)
Níquel	Determinación directa por espectroscopía de absorción atómica.	7130Cd/ 7420Pb / 7520Ni.
Plomo		
Recuento de Microorganismos	Recuento heterótrofo en placa RHP.	APHA 9215D(1989)

# **CAPÍTULO III**

## CAPÍTULO III

### PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. BOCASHI

##### 3.1.1. PRINCIPIO

El bocashi es un abono orgánico fermentado obtenido de un proceso de fermentación aerobia de materia orgánica, el producto final es semidescompuesto obtenido en un período aproximado de 13 días.

##### 3.1.2. MATERIALES

- Cascarilla de arroz
- Tamo de café
- Estiércol bovino
- Gallinaza
- *Cannavalia* (*Cannavalia ensiformis*)
- *Flemigia* (*Flemigia macrophila*)
- Ceniza de cascarilla de arroz
- Melaza
- Levadura

- Compost
- Carbón

### 3.1.3. PROCEDIMIENTO

- Preparar el área para la elaboración del bocashi, colocar una cubierta, la superficie del suelo revestir con una capa de arcilla para permitir que los lixiviados circulen. Fotografía N° 4. del anexo D
- Obtener y triturar la materia orgánica. Fotografía N° 5 del anexo D
- Colocar los ingredientes en capas, aun que no es importante el orden, se prefiere alternar una capa de materiales fuentes de carbono con otra de materiales fuentes de nitrógeno, con una capa de carbón y otra de compost. Fotografía N° 6 del anexo D
- Disolver la melaza y la levadura en agua y aplicar sobre la mezcla con una bomba mochila para garantizar una distribución uniforme del inóculo formado. Fotografía N° 7 del anexo D
- Mezclar los materiales. Fotografía N° 8 del anexo D
- Aplicar el agua uniformemente, hasta lograr una adecuada humectación y comprobar mediante la prueba de puño.
- Extender la mezcla formando un rectángulo con una altura no mayor de 60 cm y 1,5 m de ancho.
- Cubrir sólo el primer día con plástico.
- Efectuar la aireación y disminuir la altura hasta dejarla en 20 cm al octavo día y mantener esta altura hasta el final del proceso. Fotografía N° 9 del anexo D
- Controlar el pH y la temperatura del bocashi. Cuadro N° 2 y Gráficos N° 1 y 2.

### 3.1.4. CÁLCULOS

Aplicar la siguiente relación:

**Tabla IV.** *Relación de M.O. Carbón y Humus para la elaboración de bocashi.*

Cantidad de bocashi	Cantidad de componentes
350 Kg de bocashi	200 kg de MO
	100 Kg de Humus
	50 Kg de carbón

**Fuente:** Facultad de Agronomía (2007) - ESPOCH.

Del total de la MO el 40 % corresponde a carbono y según la relación C/N igual a 25/1 se determina la cantidad de nitrógeno que debe aportar la totalidad de la MO.

Con los valores del % N de toda la MO utilizada para elaborar el bocashi, que se encuentran en el Cuadro N° 20, anexo A, se establece sus cantidades, de tal forma que la suma del aporte de nitrógeno de toda la MO den como resultado el valor anterior.

La cantidad de melaza y levadura a emplear se calcula con la siguiente relación:

**Tabla V.** *Relación de melaza y levadura para la elaboración de bocashi.*

Cantidad de bocashi	Cantidad
100 Kg	1 a 1,5 L de melaza
	100 g de levadura.

**Fuente:** Facultad de Agronomía (2007) - ESPOCH.

## **3.2. COMPOST**

### **3.2.1. PRINCIPIO**

El compost es un abono orgánico que proviene del proceso de compostaje aerobio de materia orgánica, empleando un sistema mixto que corresponde a una combinación entre el sistema de pilas estáticas aireadas pasivamente y pilas dinámicas, que permite obtener el producto final en un período de tiempo aproximado de 8 a 10 semanas luego de su manejo respectivo.

### **3.2.2. MATERIALES**

- Fibra de palma
- Aserrín
- Tamo de café
- Bagazo de la caña de azúcar
- Estiércol bovino
- Materia vegetal en estado tierno
- Ceniza de cascarilla de arroz
- Compost
- Cal comercial

### **3.2.3. PROCEDIMIENTO**

- Preparación del área de compostaje, construir un sistema de recolección de lixiviados.  
Fotografía N° 10 del anexo D.

- Recolectar los materiales orgánicos de las pequeñas industrias, camales y granjas locales.
- Triturar los materiales de mayor tamaño para luego ser incorporados en forma de hileras.
- Disponer los materiales en camas de forma trapezoidal de 1,5 m de ancho en la base, por 1,0 m de alto y 12,5 m de largo. La base de las hileras es una capa de una de las fuentes de carbono, en un espesor de 10 a 15 cm. Sobre la primera capa se coloca una capa de una fuente de nitrógeno, el estiércol fresco de ganado vacuno, en un espesor aproximado de 10 cm. Luego se incorpora una tercera capa de una fuente de carbono como el tamo de café, de igual espesor que la anterior, sobre la que se coloca una fina capa de 2 cm aproximadamente, de una fuente mineral, la ceniza de cascarilla de arroz o cal agrícola. El proceso se repite hasta alcanzar una altura de un metro.
- Efectuar la aireación en forma pasiva mediante tubería PVC perforada, durante el primer mes y luego manualmente cada semana hasta el final del proceso.
- Tamizar el compost, para separar partículas gruesas, las que por lo general no han terminado el proceso de descomposición e incorporarlas en nuevas pilas.
- Almacenar el compost. Fotografía N° 11 del anexo D.

### **3.3. ENSAYO EXPERIMENTAL DE BIORREMEDIACIÓN**

#### **3.3.1 PRINCIPIO**

Para la biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos se aplicó la técnica de landfarming, empleando adicionalmente procesos de bioestimulación y bioaumentación.

### **3.3.2 MATERIALES**

#### *Ensayo experimental*

- Suelo contaminado con hidrocarburos
- Sustratos: Compost y Bocashi

#### *Construcción del área experimental*

- Plástico de invernadero
- Geomembrana
- Pingos
- Malla sarán
- Pintura
- Palas
- Picos
- Carretilla
- Clavos
- Rótulos
- Arcilla

### **3.3.3 PROCEDIMIENTO**

- Cubrir el área con plástico de invernadero fijo a un soporte de madera, la superficie del suelo revestir con geomembrana, rodear el área con un muro de arcilla de 20 cm de alto para impedir el ingreso de agua lluvia al ensayo experimental, y canales de 30 cm de ancho y 10 cm de profundidad para la recolección y conducción del agua lluvia a la

tubería de drenaje, alrededor del área de experimentación colocar malla sarán.

Fotografía N° 12 del anexo D.

- Acondicionar el suelo contaminado con hidrocarburos, para lo cual se transporta hacia el área del ensayo experimental, se tiende el suelo, se tritura y mezcla en forma manual.

Fotografía N° 13 del anexo D.

- Disponer cada unidad experimental en forma trapezoidal de 1,20 m de ancho por 1,50 m de largo con una altura variable, con su respectiva identificación y en posiciones aleatorias.
- Colocar una cantidad constante de suelo de 0,30 m<sup>3</sup> y adicionar los dos abonos orgánicos (Compost y Bocashi) en un 30 %, 20 % y 10 %, en relación Volumen/Volumen (V/V) respectivamente. Fotografía N° 14 del anexo D.
- Realizar el monitoreo de las variables respuesta como son TPH y metales pesados y las variables control como lo es el RHP, el pH y temperatura del suelo y la temperatura y humedad ambiental del área de ensayo experimental. Fotografía N° 15 del anexo D.
- Efectuar la humectación de cada tratamiento aplicando 7 L de agua cada dos a tres días, según las condiciones del suelo y verificar con la prueba de puño. Fotografía N° 16 del anexo D.
- Aireación manual de cada tratamiento pasando un día. Fotografía N° 16 del anexo D.

### **3.4. BIOESTIMULACIÓN**

#### **3.4.1. PRINCIPIO**

El proceso de bioestimulación equilibra la cantidad de nutrientes existentes en cada unidad experimental a la relación C/N/P/K 100/10/1/1 requerida en el tratamiento del suelo mediante la técnica de Landfarming.

#### **3.4.2. MATERIALES Y REACTIVOS**

- Balanza
- Bomba de mochila
- Urea
- Sulfato de potasio.

#### **3.4.3. PROCEDIMIENTO**

- Realizar los cálculos respectivos de balance de macronutrientes en cada unidad experimental, la concentración requerida, la deficiencia, el fertilizante y la cantidad a aplicar.
- De acuerdo con las propiedades del fertilizante inorgánico seleccionado aplicarlo en campo, así: la urea se puede aplicar sólida o disuelta en agua para garantizar formas disponibles rápidas de nitrógeno para las bacterias existentes, el sulfato de potasio puede ser aplicado en su estado sólido directamente al suelo a biorremediar. Fotografía N° 18 del anexo D

- Regular las dosificaciones del fertilizante en el transcurso de la biorremediación.
- Realizar la bioestimulación de campo en las horas de la mañana y con el equipo de protección necesario.

#### 3.4.4. CÁLCULOS

##### a) *Balance de nutrientes*

El balance de nutrientes (C, N, P y K) de cada tratamiento se lo realiza determinando la concentración de cada uno de ellos utilizando la siguiente ecuación:

$$C = A \times B + C \times D \quad \text{Ecuación N° 2.}$$

**DONDE:**

**A=** Peso de suelo empleado en la unidad experimental (Kg).

**B=** Concentración del nutriente (C, N, P, K) en el suelo (Kg de nutriente/Kg de suelo).

**C=** Peso de sustrato empleado en la unidad experimental (Kg).

**D=** Concentración del nutriente (C, N, P, K) en el sustrato (Kg de nutriente /Kg de sustrato).

##### b) *Determinación de la concentración requerida de los nutrientes*

Utilizando la relación C/N/P/K (100/10/1/1) se calcula la concentración requerida de nutrientes a partir de la cantidad de C contenido en cada unidad experimental.

**c) Determinación del excedente o faltante de los nutrientes**

Se determina el excedente o faltante de nutrientes para llegar a la concentración requerida utilizando la siguiente ecuación:

$$E = F - G$$

*Ecuación N° 3*

**DONDE:**

**E**= excedente (+) o faltante (-) del nutriente analizado para la unidad experimental (Kg).

**F**= Concentración del nutriente (C, N, P, K) requerida.

**G**= Concentración del nutriente (C, N, P, K) existente.

**d) Determinación de la cantidad de nutrientes a aplicar en cada tratamiento.**

Según los resultados anteriores se establece el déficit y se escoge que fertilizante aplicar. Para la deficiencia de nitrógeno se empleó urea que contiene 46 % de N y para la del potasio se aplicó sulfato de potasio con una concentración de 50 % de K<sub>2</sub>O y 0,82 de k.

### **3.5. BIOAUMENTACIÓN**

#### **3.5.1. PRINCIPIO**

El proceso de bioaumentación se realizó utilizando un consorcio de cepas de bacterias nativas, el consorcio SACHA conformado por las cepas 1, 6, 21, 68 y 71, cepas aisladas, identificadas y caracterizadas, por el grupo técnico de LACIB, de las piscinas intervenidas en el Campo Sacha.

### 3.5.2. MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

#### *Preparación del inóculo*

- Matraces
- Incubadora con agitación
- autoclave
- Medio mineral.

#### *Aplicación en campo*

- Balde
- Regadera
- Frascos

### 3.5.3. PROCEDIMIENTO

- Reactivar cada una de las cepas secundarias del consorcio SACHA en agar nutritivo, mediante siembra en superficie por estriamiento, incubar a 30 °C por 24 horas (13). Fotografía N° 19 y 20 del anexo D.
- Preparar un frotis, realizar tinción gram para verificar la pureza de las cepas y la descripción morfológica. Cuadro N° 5 y 6. Fotografía N° 21 del anexo D.
- Efectuar el proceso de bioaumentación en matraces, para lo cual se prepara un preinóculo al 5 % del volumen total de inóculo a emplear en los tratamientos, utilizando el medio mineral que se encuentra en la Tabla N° VII del anexo B, realizando en él la siembra de las cepas reactivadas, este preinóculo es incubado a 30 °C en una incubadora con agitación mecánica por un período de tiempo de 22 horas, por cuanto, el

crecimiento debe encontrarse en fase exponencial para asegurar el desarrollo del mayor número de unidades formadoras de colonias, organismos viables, en el inóculo.

- Preparar el inóculo a ser aplicado en la totalidad de las unidades experimentales a partir del preinóculo, de la misma forma que el preinóculo. Fotografía N° 22 del anexo D.
- Aplicar en campo con la una regadera en las horas de la mañana. Fotografía N° 23 del anexo D.

### **3.6. MEDICIÓN DE VARIABLES**

A continuación se describen los procedimientos realizados durante el proceso de biorremediación para los parámetros de estudio y de control (TPH, metales pesados RHP y pH).

#### **3.6.1 HIDROCARBUROS TOTALES DE PETROLEO (TPH)**

##### **3.6.1.1 PRINCIPIO**

Se realiza una extracción con S-316 un dímero del freón, para lograr la remoción de las sustancias polares en el extracto y se realiza la determinación por espectroscopía infrarroja.

##### **3.6.1.2 MATERIALES EQUIPO Y REACTIVOS**

- Tubos de ensayo
- Gradillas

- Papel filtro
- Espectrofotómetro infrarrojo
- Agitador mecánico
- ultrasonido
- S-316
- Sílica Gel
- Sulfato de Sodio anhidro

### 3.6.1.3 PROCEDIMIENTO

- Prepara la muestra de suelo antes de realizar el análisis, efectuando la homogenización, el cuarteo, secado a 45 °C y la trituración.
- El primer paso es la extracción, para lo cual se pesa 2 g de la muestra seca a 45 °C, se agrega 1,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se agrega 10 mL de S-316 y se realiza una extracción ultrasónica (EPA 3550C) agitando por 1 min en el agitador mecánico luego se somete a la acción del ultrasonido por 10 min, se realiza esta operación por tres veces.
- Luego la etapa de purificación en la que se deja en reposo por 30 min y se transfiere la fase líquida a un tubo con sílica gel se realiza una extracción ultrasónica, se deja en reposo por 10 min y se filtra.
- Lectura del extracto en el Espectrofotómetro infrarrojo.

## **3.6.2 METALES PESADOS**

### **3.6.2.1 PRINCIPIO**

La determinación de metales pesados en muestras de suelo incluye una digestión ácida de la muestra y la determinación de Cd, Ni, Pb (RAOH decreto 1215) por absorción atómica.

### **3.6.2.2 MATERIALES EQUIPO Y REACTIVOS**

- Tubos digestor
- Pipeta de 10 mL
- Balón aforado de 100 mL
- Papel filtro.
- Balanza analítica
- Digestor
- Equipo de Absorción Atómica.
- Ácido nítrico concentrado

### **3.6.2.3 PROCEDIMIENTO**

- Preparar la muestra de suelo antes de realizar el análisis, efectuando la homogenización, el cuarteo, secado a 45 °C y trituración.
- Pesar 5 g de la muestra preparada, se la coloca en un tubo digestor se agrega 10 mL de  $\text{HNO}_{3(c)}$  y 10 mL de agua bidestilada,
- Digestar por dos horas a 150 °C, se deja enfriar, se adiciona 60 mL agua bidestilada, se deja en reposo.

- Filtrar el contenido con mucho cuidado de no dejar pasar sedimento y se afora a 100 mL con agua bidestilada.
- Lectura del extracto es leído en absorción atómica para determinar Cd, Ni, Pb.

### **3.6.3 RECUENTO HETERÓTROFO EN PLACA (RHP)**

#### **3.6.3.1 PRINCIPIO**

Consiste en determinar el número de heterótrofos viables presentes en una muestra de suelo en el momento de la recogida, al disponerlos en un medio sólido nutritivo que contiene los nutrientes necesarios para su crecimiento, considerando a las colonias que se forman como una célula viable en el cultivo original.

#### **3.6.3.2 MATERIALES EQUIPO Y REACTIVOS**

- Frascos estériles
- Cajas petri
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Pipeta automática
- Puntas para 1 mL.
- Mechero
- Balanza Analítica
- Autoclave

- Incubadora
- Agar nutritivo
- Agua de peptona

### **3.6.3.3 PROCEDIMIENTO**

- La muestra recolectada es inmediatamente procesada en el laboratorio.
- Esterilizar los materiales en el autoclave.
- Pesar 10 g de muestra en un frasco estéril.
- Realizar diluciones seriadas en base 10, utilizando como diluyente agua de peptona al 1%, hasta las  $10^{-7}$ .
- Proceder a la siembra en profundidad de cada dilución en agar nutritivo.
- Incubar por 24 horas a 30 °C.
- Realizar el conteo de las colonias en cada dilución sembrada y se expresa el resultado en UFC/g de suelo. Fotografía N° 24 del anexo D.

### **3.6.4 POTENCIAL HIDRÓGENO (pH)**

#### **3.6.4.1 PRINCIPIO**

La medición del pH del suelo se la realizó utilizando un potenciómetro con electrodos de vidrio, que mide el potencial eléctrico generado por el hidrógeno de la solución.

#### **3.6.4.2 MATERIALES EQUIPO Y REACTIVOS**

- Frascos tapa rosca
- Probeta
- Agitador
- pH-metro
- Balanza analítica
- Buffer pH 4, 7 y 10
- Agua bidestilada

#### **3.6.4.3 PROCEDIMIENTO**

- La lectura de pH se la realiza en la muestra sin procesar.
- Preparar una suspensión de suelo-agua en una relación de (1:5), agitar vigorosamente y se deja en reposo hasta que las partículas de suelo decanten y se observe dos fases.
- Lectura del pH con el potenciómetro calibrado, en la solución mientras se agita la mezcla.

# **CAPÍTULO IV**

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 ELABORACIÓN DE BOCASHI

La cantidad total de bocashi necesario para el ensayo experimental fue de 260 Kg. Para fabricar esta cantidad se empleó cascarilla de arroz, tamo de café, ceniza de cascarilla de arroz, estiércol bovino, gallinaza, leguminosas como la canavalia y flemigia, carbón, compost melaza y levadura, sus cantidades se han determinado en función de las relaciones planteadas en la tabla IV y V y se detallan en el cuadro N° 1.

**Cuadro N° 1** Cantidad de materiales empleados en la fabricación de bocashi.

<b>Materiales</b>	<b>Cantidad</b>
<i>Cascarilla de arroz</i>	30 kg
<i>Tamo de café</i>	30 kg
<i>Ceniza de cascarilla de arroz</i>	26 kg
<i>Estiércol Bovino</i>	22 kg
<i>Gallinaza</i>	20 kg
<i>Canavalia ( <i>Cannavalia ensiformis</i>)</i>	15 kg
<i>Flemigia ( <i>Flemigia macrophila</i>)</i>	6 kg
<i>Carbón</i>	37 kg
<i>Compost</i>	74 kg
<i>Melaza</i>	4L
<i>Levadura</i>	0,200 kg
<i>Agua</i>	12 L

La cantidad de 260 kg de bocashi está conformada por 149 kg de MO, la misma que aporta con 59,40 Kg de C y 2,38 Kg de N, cumpliendo la relación C/N 25/1, adecuada para el proceso de elaboración de bocashi, Suquilanda (1996).

Empleando las cantidades de los materiales del bocashi se procedió a su fabricación aplicando el procedimiento establecido para su elaboración que se encuentra en el capítulo III, mediante el cual el proceso de fermentación duró 13 días, obteniendo el producto con una coloración grisácea, aspecto polvoso, consistencia suelta, seco y sin olor desagradable, características indicativas del final del proceso de fermentación.

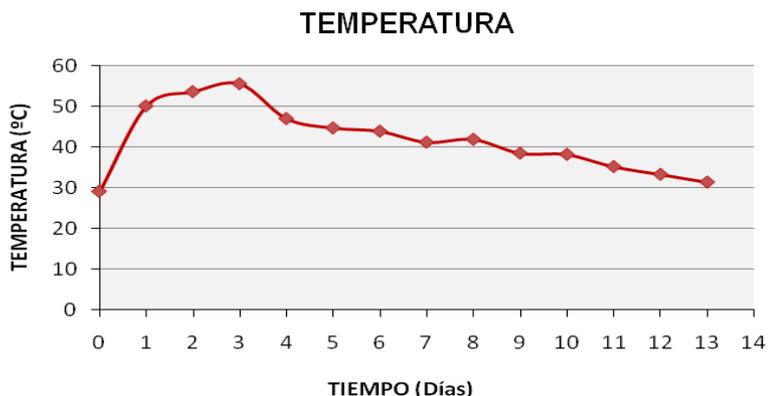
Durante el período de fermentación se llevó a cabo el control de la temperatura, pH y aireación, sus datos se enlistan en el cuadro N° 2.

**Cuadro N° 2** *Control de pH, temperatura y aireación durante el proceso de fermentación del Bocashi.*

TIEMPO (días)	TEMPERATURA (°C)	pH	AIREACIÓN
0	29	7	0
1	50	7	1
2	53,53	8	4
3	55,46	8	4
4	46,9	8	4
5	44,6	8	4
6	43,8	8	3
7	41,1	8	3
8	41,8	8	2
9	38,4	7	2
12	33,2	7	2
13	31,3	7	2

La variación de temperatura y pH durante el proceso de elaboración del bocashi se evidencia en los gráficos N° 1 y 2:

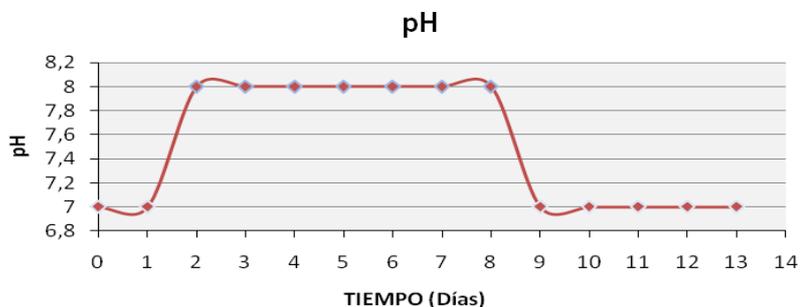
**Gráfico N° 1.** Variación de temperatura (°C) durante el proceso de elaboración de bocashi.



La etapa de fermentación se inicia con el incremento de la temperatura; inicialmente los residuos se encuentran a temperatura ambiente, los microorganismos crecen y la temperatura sube (28), la temperatura máxima de 55,46 °C se presentó al tercer día de su elaboración, ésta coincide con el incremento del pH. Al quinto día desciende en aproximadamente 10 °C por disminución de la fuente energética. Luego se inicia la etapa de estabilización en la que el declive de la temperatura es muy próximo entre sí. Al décimo tercer día la temperatura desciende hasta una temperatura similar a la del ambiente, esto demuestra que el proceso de fermentación del bocashi a finalizado.

El incremento mayor a 50 °C durante el segundo y tercer día, obligó al aumento del número de aireaciones. Este proceso se cumple de acuerdo a las recomendaciones dadas para la Producción de Abonos Orgánicos (28).

**Gráfico N° 2.** Variación de pH durante el proceso de elaboración de bocashi.



El pH se incrementó a 8 en el segundo día de fermentación, como resultado de la transformación de sustancias orgánicas, llevada a cabo por las levaduras inoculadas, mediante reacciones de oxido-reducción a sustancias alcalinas, este comportamiento se mantiene hasta el octavo día, luego el pH desciende a 7 hasta el final del proceso, esto se debe al agotamiento de la fuente energética y a la estabilización del proceso de fermentación, Producción de Abonos Orgánicos (28).

## 4.2 CARACTERIZACIÓN DE SUSTRATOS

### 4.2.1 BOCASHI

Según los resultados de caracterización del bocashi obtenido, cuadro N° 3, el valor de densidad real de 1.340 Kg/m<sup>3</sup> se encuentra por debajo del rango de 1.450 a 2.600 Kg/m<sup>3</sup> establecido para un sustrato, sabiendo que dicho valor depende del tipo de materiales empleados en su fabricación, en este caso, la cascarilla de arroz al ser un material liviano disminuye este valor. El valor de densidad aparente de 190 Kg/m<sup>3</sup> está dentro del rango de 100 a 700 Kg/m<sup>3</sup> establecido para un sustrato y el valor de porosidad de 85,19 % está por encima del valor mínimo de 80 % establecido para un sustrato (24) (30).

El bocashi obtenido es ligeramente alcalino, (pH 7,97), por tanto este sustrato en el proceso de biorremediación incrementa el pH del suelo mejorando las condiciones para el crecimiento de las bacterias.

El contenido de MO de 44,55 % en el bocashi es alto, esto hace que el contenido de COT también lo sea y por tanto al ser empleado como sustrato en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, existe un aporte de carbono tal que la relación C/N/P/K del suelo sube, incrementando la necesidad de nutrientes inorgánicos para ajustar dicha relación a los requerimientos en el tratamiento biológico.

Los resultados del bocashi de 1,2 % de N, valor menor que en el compost, de 1.903 mg/Kg de P y 2.876 mg/Kg de K, valores mayores que en compost, indican que al momento de ser aplicado el bocashi como sustrato en el suelo para la biorremediación será mayor el requerimiento de N y menor el de P y K para ajustar la relación 100/10/1/1 de C/N/P/K necesaria para llevar a cabo el tratamiento biológico.

Los resultados de nutrientes de Mg, Zn, y Mn del bocashi son mayores que los obtenidos en el compost y menores para el caso del Ca, Fe y Cu. La relación C/N de 21,43 expone un contenido de nitrógeno menor al esperado, debido posiblemente a las pérdidas generadas por el incremento de temperatura mayor a 50 °C, además un alto contenido de material lignocelulósico no descompuesto, Benzina (2001).

El número de heterótrofos totales en el bocashi de  $29 \times 10^6$  UFC/g suelo es mayor que en el compost.

#### 4.2.2 COMPOST

Según los resultados obtenidos en el compost, cuadro N° 3, el valor de densidad real de 1.540 Kg/m<sup>3</sup> y de densidad aparente 200 Kg/m<sup>3</sup> se encuentran dentro de los rangos establecidos para un sustrato orgánico (1.450 a 2.600) (100 a 700) Kg/m<sup>3</sup> respectivamente; el valor de porosidad de 87,47 % al igual que en el bocashi está por encima del valor mínimo para un sustrato (80%) (24) (30).

El compost presenta un pH de 7,66 por tanto es un sustrato orgánico ligeramente alcalino, al igual que el bocashi este influye directamente en el pH del suelo al incrementar su valor durante la biorremediación, lo que beneficia a las poblaciones de bacterias al ser un factor determinante durante su crecimiento.

El valor de MO de 43,31 % es menor que en el bocashi, esto involucra un menor contenido de COT, que al relacionarlo con el contenido de 1,6 % de N, mayor que en el bocashi, 1.296 mg/Kg de P y 1.301 mg/Kg de K, mucho menores que en el bocashi, para ajustar la relación 100/10/1/1 de C/N/P/K necesaria en el tratamiento biológico, indican que al momento de aplicar compost como sustrato en la biorremediación de suelos el requerimiento de N será menor que en el tratamiento con bocashi y mayores para P y K.

El resultado de la relación C/N del 15,22 % para el compost indica la degradación de la materia orgánica ocurrida en el proceso de compostaje y su estabilización, Suquilanda (1996).

El número de heterótrofos totales en el compost de  $27 \cdot 10^5$  UFC/g suelo es menor debido al proceso de lavado del compost ocurrido durante el compostaje.

Los resultados de caracterización de sustratos se encuentran en el cuadro N° 3.

**Cuadro N° 3** Resultados de la caracterización de los dos sustratos.

Parámetros	Unidades	Resultados	
		BOCASHI	COMPOST
Densidad real	kg/m <sup>3</sup>	1.340	1.500
Densidad aparente	kg/m <sup>3</sup>	190	200
Porosidad	%	85,19	87,47
pH	----	7,97	7,66
MO	%	44,55	43,31
COT	%	25,78	25,12
N	%	1,20	1,65
P	mg/Kg	1.903	1.296
C/N	----	21,43	15,22
K	mg/Kg	2.876	1.301
Ca	mg/Kg	2.417	4.352
Mg	mg/Kg	4.988	4.344
Zn	mg/Kg	62,98	35,68
Fe	mg/Kg	2.432	3.278
Cu	mg/Kg	19,10	33,27
Mn	mg/Kg	208,09	131,79
RHP	UFC/g suelo	29*10 <sup>6</sup>	27*10 <sup>5</sup>

#### 4.3 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS

Los resultados del suelo contaminado con hidrocarburos que se encuentra en el cuadro N° 4 referente a las densidades demuestran que: la densidad real de 1.700 kg/m<sup>3</sup> es inferior a la establecida para un suelo mineral 2.600 a 2.700 kg/m<sup>3</sup>, estas variaciones se presentan en suelos arcillosos de acuerdo con el contenido de materia orgánica; mientras que el valor de densidad

aparente de  $1.250 \text{ kg/m}^3$  se encuentra dentro del rango de  $1.000$  a  $1.600 \text{ kg/m}^3$  establecido para suelos superficiales. El valor de  $29 \%$  de porosidad del suelo evidencia un suelo compactado, Buckman (1985).

El suelo contaminado con hidrocarburos presenta un pH de  $6,43$  por tanto es ligeramente ácido, este comportamiento es típico para suelos de climas húmedos, como lo es en Sacha, debido a que las precipitaciones son altas como para lixiviar las bases, según Buckman (1985). Este valor se encuentra dentro del rango permitido para aplicar la técnica de landfarming según los parámetros establecidos en Eweis (1999). Quien además establece que la capacidad de campo para un suelo va de  $18$  a  $30 \%$  en función del contenido de arcilla, por lo que el valor de  $27 \%$  en el suelo caracterizado es un valor normal para un suelo arcilloso.

Los resultados de MO de  $5,88 \%$  y COT de  $3,41 \%$  están dentro de los valores normales para un suelo arcilloso, de  $(3$  a  $6) \%$  y  $(1,7$  a  $3,4) \%$  respectivamente, establecido en Eweis (1999). Dentro del análisis de macronutrientes C/N/P/K relación  $100/10/1/1$  utilizada para aplicar el tratamiento biológico de suelos por landfarming, se determinó la deficiencia de nitrógeno, exceso de fósforo y equilibrio de potasio, evidenciándose la necesidad de bioestimulación de nitrógeno.

El valor de  $4.208 \text{ mg/Kg}$  de TPH es superior al límite permisible para suelo agrícola ( $2.500 \text{ mg/Kg}$ ) establecido en la Tabla 6, Decreto 1215. Los valores de metales pesados de  $14,17 \text{ mg/kg}$  de Cd,  $0,46 \text{ mg/kg}$  de Ni y  $4,46 \text{ mg/kg}$  de Pb, indican que se encuentran dentro de los límites permisibles de dicho decreto, (Cd:  $< 2 \text{ mg/Kg}$ ; Ni:  $< 50 \text{ mg/Kg}$ ; Pb:  $< 100 \text{ mg/Kg}$ ).

El RHP revela un número de bacterias heterótrofas insuficiente ( $10^5$  UFC) para la realización de un proceso de biorremediación y por tanto la necesidad de bioaumentación para alcanzar el rango óptimo de  $10^8$  UFC/g de suelo, LACIB (2007).

Los resultados de caracterización del suelo se enlistan en el cuadro N° 4:

**Cuadro N° 4** *Resultados de la caracterización del suelo contaminado con hidrocarburos.*

PARÁMETRO	UNIDADES	RESULTADO
Densidad real	kg/m <sup>3</sup>	1.700
Densidad aparente	kg/m <sup>3</sup>	1.250
Porosidad	%	29
Textura	----	ARCILLOSA
Capacidad de campo	%	27
pH	---	6,43
TPH	mg/kg	4.208
Ni	mg/kg	14,17
Cd	mg/kg	0,46
Pb	mg/kg	4,46
MO	%	5,88
COT	%	3,41
N	%	0,11
P	%	870
C/N	---	31
K	mg/Kg	343,2
Ca	mg/Kg	151,12
Mg	mg/Kg	5.812
Zn	mg/Kg	102,63
Fe	mg/Kg	44.276
Cu	mg/Kg	72,35
Mn	mg/Kg	587,73
RHP	UFC/g suelo	48*10 <sup>5</sup>

## **4.4 ENSAYO EXPERIMENTAL DE BIORREMEDIACIÓN**

### **4.4.1 BIOESTIMULACIÓN**

Según los resultados del balance de macronutrientes C/N/P/K que existe en cada tratamiento y la concentración requerida y faltante de tales nutrientes, se evidenció un déficit de nitrógeno y un excedente de fósforo de acuerdo con la relación C/N/P/K 100/10/1/1 necesaria para llevar a cabo el tratamiento biológico por landfarming, para acelerar la tasa de degradación de los hidrocarburos por las bacterias del suelo, Rittmann 2001. El potasio se encuentra en déficit en el caso del tratamiento con el sustrato a1 (compost) y en equilibrio con el sustrato a2 (bocashi). Por tanto, el incremento se efectuó para el nitrógeno con urea y el potasio con sulfato de potasio; en cuanto al excedente de fósforo, al considerar que a mayores contenidos se incrementa la degradación, se trabajó en estas condiciones.

### **4.4.2 BIOAUMENTACIÓN**

El consorcio-Sacha conformado en base a los estudios de selección, caracterización e identificación de cepas de bacterias nativas degradadoras de hidrocarburos realizados por el equipo técnico de LACIB, fue empleado en ésta investigación para aumentar las poblaciones de bacterias en el suelo durante el proceso de biorremediación y así incrementar la tasa de degradación de hidrocarburos, Atlas 2002.

El proceso de bioaumentación se realiza siguiendo el procedimiento establecido para dicho fin que se encuentra en el capítulo III. La caracterización morfológica y descripción macroscópica de

las cepas (1, 6, 21, 68 y 71) del consorcio-Sacha de bacterias nativas degradadoras de hidrocarburos, se enuncia en los cuadros N° 5 y N° 6:

**Cuadro N° 5** *Caracterización morfológica de las cepas bacterianas*

BACTERIA	FORMA CELULAR	TINCIÓN GRAM
Cepa 1	<i>Bacillus</i>	Gram positiva
Cepa 6	<i>Bacillus</i>	Gram negativa
Cepa 21	<i>Bacillus</i>	Gram positiva
Cepa 68	<i>Bacillus</i>	Gram negativa
Cepa 71	<i>Bacillus</i>	Gram positiva

Fuente: LACIB 2007

**Cuadro N° 6** *Descripción macroscópica de las cepas bacterianas*

BACTERIA	TAMAÑO	FORMA	COLOR	CONTEXTURA DEL BORDE	ELEVACIÓN
Cepa 1	Grande	Dispersa	Blanca	Irregular	Plana
Cepa 6	Grande	Redonda	Blanca	Regular	Convexa
Cepa 21	Grande	Irregular	Blanca	Irregular	Plana
Cepa 68	Pequeña	Redonda	Verdosa	Regular	Convexa
Cepa 71	Grande	Irregular	Blanca	Irregular	plana

Fuente: LACIB 2007

La cantidad de inóculo requerido para aplicar en todas las unidades experimentales fue de 1,4 L. según la relación establecida para realizar el proceso de bioaumentación, LACIB 2007.

El proceso de bioaumentación en matraces se realizó en dos ocasiones, el conteo de microorganismos fue de  $64 \times 10^{18}$  UFC/mL de inóculo preparado y  $54 \times 10^{18}$  UFC/mL de inóculo

preparado respectivamente. El inóculo fue aplicado en cada unidad experimental con la ayuda de una regadera en las horas de la mañana.

#### **4.5 ESTUDIO DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS APLICANDO DOS SUSTRATOS MEDIANTE LANDFARMING**

El grado de descontaminación durante el proceso de biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos por la técnica de landfarming se evaluó mediante el monitoreo de las variables respuestas y las variables control para cada uno de los tratamientos.

##### **4.5.1 VARIABLES CONTROL**

###### **4.5.1.1 HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (TPH)**

Como se observa en el cuadro N° 7 y el gráfico N° 3 la concentración de TPH en el suelo al inicio de la biorremediación (tiempo 1) se encuentran por encima del límite permisible (< 2500 mg/Kg) para suelo agrícola establecido en el RAHO, Decreto 1215, cuyos valores están sobre los 4.045 mg/Kg. Siendo que la biodisponibilidad de los hidrocarburos se reduce al incrementarse las fracciones más pesadas de los hidrocarburos, según se establece en Eweis (1999) este suelo es más difícil de biorremediar.

Luego de mes y medio (tiempo 2) de iniciado el proceso de biorremediación, la concentración de TPH empieza a disminuir en todos los tratamientos, gracias a la acción de los microorganismos

del suelo, principalmente a las bacterias y a la estimulación constate de su crecimiento mediante el control de las variables abióticas.

A los tres meses (tiempo 3) esta disminución se incrementa para todos los tratamientos, siendo mayor en el tratamiento con bocashi al 30 %. Además en el tratamiento testigo también existe un declive debido posiblemente al proceso de atenuación natural, como se establece en Rittmann (2001).

Durante el cuarto mes (tiempo 4) de biorremediación la concentración de TPH disminuye por debajo del límite permisible, en todos los tratamientos exceptuando el testigo, siendo el mejor tratamiento aplicado con bocashi en la concentración al 30 %.

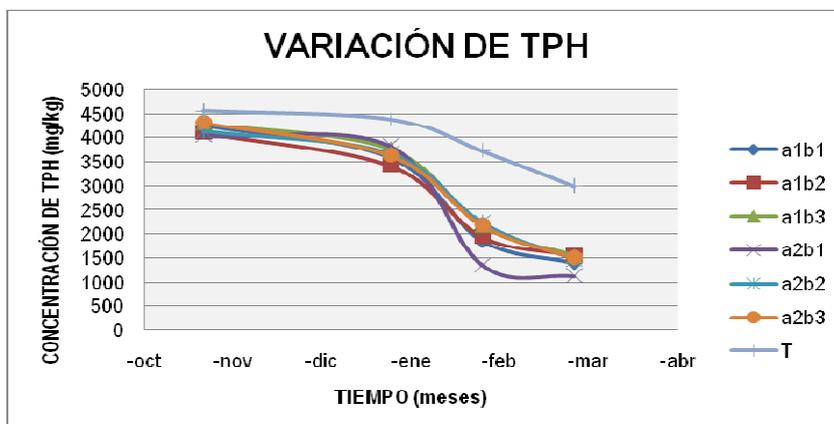
Los resultados de la concentración de TPH se presentan en el siguiente cuadro:

**Cuadro N° 7** Concentración de TPH (mg/Kg).

TRATAMIENTOS		TPH (mg/kg) / Tiempo (meses)			
		1	2	3	4
Compost 30%	a1b1	4.258	3.602	1.58	1.401
Compost 20%	a1b2	4.100	3.422	1.947	1.555
Compost 10%	a1b3	4.294	3.777	2.177	1.548
Bocashi 30%	a2b1	4.045	3.834	1.346	1.122
Bocashi 20%	a2b2	4.130	3.679	2.237	1.471
Bocashi 10%	a2b3	4.322	3.634	2.178	1.492
Testigo	T	4.557	4.384	3.730	2.993

La variación de TPH en función del tiempo de biorremediación se expresa en el gráfico siguiente:

**Gráfico N° 3.** Variación de TPH (mg/Kg) durante el proceso de biorremediación.



### TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Del análisis estadístico de los datos obtenidos de la concentración de TPH en el suelo (anexo C), se establece que:

Al inicio de la biorremediación existe ausencia de efectos significativos de los factores a y b y la interacción axb, sobre la concentración de la variable respuesta TPH. Con un coeficiente de variación de 6,05 % que indica la confiabilidad de los datos.

Durante el segundo mes de biorremediación, según el análisis de varianza existen diferencias significativas para la concentración de TPH al comparar los tratamientos con el testigo, presentando un coeficiente de variación del 5,14 %. Según la prueba de comparación múltiple de Tukey, los tratamientos a1b1, a1b2, a2b2 y a2b3 son los tratamientos en los que la disminución de la variable respuesta TPH es significativa.

En el caso del tercer mes de biorremediación, existen efectos significativos generados por el factor b y al comparar los tratamientos con el testigo, con un coeficiente de variación de 13,48 %.

Según la prueba de comparación múltiple Tukey el tratamiento en el que se logra la mayor disminución para la variable respuesta TPH es el a2b1, (Bocashi al 30 %).

Para el cuarto mes de biorremediación no existen diferencias significativas en la concentración final de TPH en los tratamientos, de tal forma que, no existe efectos significativos del factor a, factor b y su interacción sobre la variable respuesta TPH, con una confiabilidad de datos del 15,92 %. Todos los tratamientos presentan diferencias significativas al relacionarlos con el testigo. Estos resultados quieren decir que, el cambio entre los diferentes niveles de los factores no incide en la variación de la concentración de TPH. Cuadro N° 8.

**Cuadro N° 8** Comparación múltiple de Tukey para TPH en el cuarto mes de biorremediación.

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN MEDIA DE TPH (mg/kg)	COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS
T: 7	2.993	A
a1b2: 2	1.555	B
a1b3: 3	1.548	B
a2b3: 6	1.492	B
a2b2: 5	1.471	B
a1b1: 1	1.401	B
a2b1: 4	1.122	B

#### 4.5.1.2 CADMIO (Cd)

Según el cuadro N° 9 y el gráfico N° 4 se observa que:

La concentración de cadmio al inicio del proceso de biorremediación (tiempo 1) se encuentra por debajo del límite permisible (< 2 mg/Kg), para suelo agrícola según el RAOH, Decreto 1215, cuyo

valor es superior a 0,43 mg/Kg. Variando la concentración en los diferentes tratamientos debido que los metales pesados en suelos arcillosos están sujetos a diferentes mecanismos de retención e inmovilización, según lo establece Seoáñez (1999).

Luego de iniciado el proceso de biorremediación, al mes y medio (tiempo 2) se evidencia una disminución de la concentración en todos los tratamientos siendo mayor en el tratamiento a1b2 y menor en el tratamiento a2b3, esta disminución no se observa en el testigo.

Al tercer mes (tiempo 3) este valor disminuye por debajo del límite de detección del equipo que es 0,24 mg/Kg de suelo, siendo así, no se puede determinar cuánto disminuye luego de cuatro meses de biorremediación (tiempo 4); esta disminución también se observa en el tratamiento testigo.

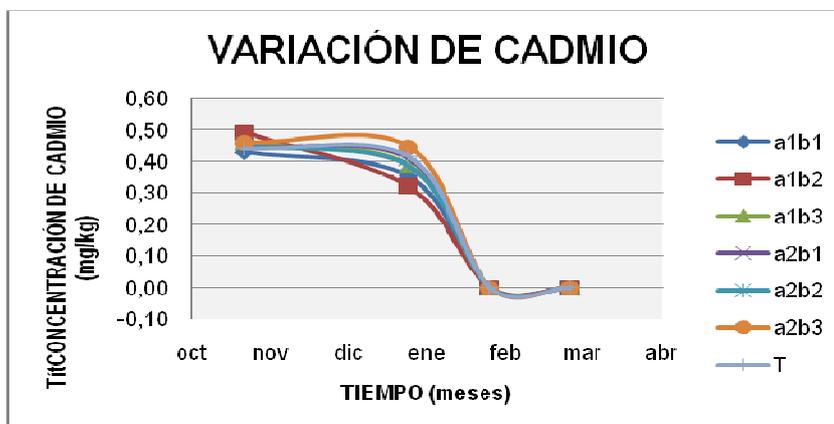
Los resultados de la concentración de Cd se presentan en el siguiente cuadro:

**Cuadro N° 9** Concentración de cadmio (mg/Kg).

TRATAMIENTOS		Cd (mg/kg) / Tiempo (meses)			
		1	2	3	4
Compost 30%	a1b1	0,43	0,35	<0,24	<0,24
Compost 20%	a1b2	0,49	0,32	<0,24	<0,24
Compost 10%	a1b3	0,46	0,39	<0,24	<0,24
Bocashi 30%	a2b1	0,45	0,41	<0,24	<0,24
Bocashi 20%	a2b2	0,45	0,39	<0,24	<0,24
Bocashi 10%	a2b3	0,46	0,45	<0,24	<0,24
Testigo	T	0,44	0,42	<0,24	<0,24

La variación de cadmio en función del tiempo de biorremediación se expresa en el gráfico siguiente:

**Gráfico N° 4.** Variación de cadmio (mg/Kg) durante el proceso de biorremediación.



### TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Según el análisis estadístico para los resultados de Cadmio (anexo C), se establece que:

En la primera observación se evidencia diferencias significativas entre los resultados de la variable respuesta Cd de tal forma que el tratamiento a1b1, T, a2b1 y a2b2 son los tratamientos que presentan una menor concentración de Cd, seguido por el tratamiento a1b3 y a2b3 y el tratamiento con un mayor contenido de cadmio es el a1b2. El efecto significativo es del factor b sobre la concentración de cadmio en los diferentes tratamientos. El coeficiente de variación es de 2,35 %.

En el segundo mes existe disminución de la concentración de cadmio en los distintos tratamientos generando un efecto significativo el factor a y el factor b sobre la concentración de cadmio, con un coeficiente de variación de 3,54 %. Según la prueba de comparación múltiple Tukey el compost en la concentración del 20 % es en la que se logra disminuir considerablemente la concentración de cadmio. Cuadro N° 10.

**Cuadro N° 10** Comparación múltiple de Tukey para cadmio en el segundo mes de biorremediación.

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN MEDIA DE Cd (mg/kg)	COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS
a2b3: 6	0,4467	A
T: 7	0,4167	AB
a2b1: 4	0,4100	B
a1b3: 3	0,3900	BC
a2b2: 5	0,3867	BC
a1b1: 1	0,3533	CD
a1b2: 2	0,3200	D

A partir del tercer mes no se realizó el análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple Tukey, ya que los valores se encuentran por debajo del límite de detección del equipo, esto no incide en el proceso de biorremediación porque el Cd está dentro de los límites permisibles del RAOH, decreto 1215.

#### 4.5.1.3 NÍQUEL (Ni)

Según el cuadro N° 11 y el gráfico N° 5, al inicio de la biorremediación (tiempo 1) la concentración de níquel en el suelo se encuentra por debajo del límite permisible (< 50 mg/Kg) para suelo agrícola, RAOH, Decreto 1215. Este valor disminuye a medida que se incrementa el tiempo de biorremediación (tiempo 2, 3, 4), manteniendo un comportamiento aproximadamente igual tanto en los tratamientos como en el testigo. Con lo que la aplicación del proceso de biorremediación con sustratos orgánicos no genera cambio en el comportamiento del níquel.

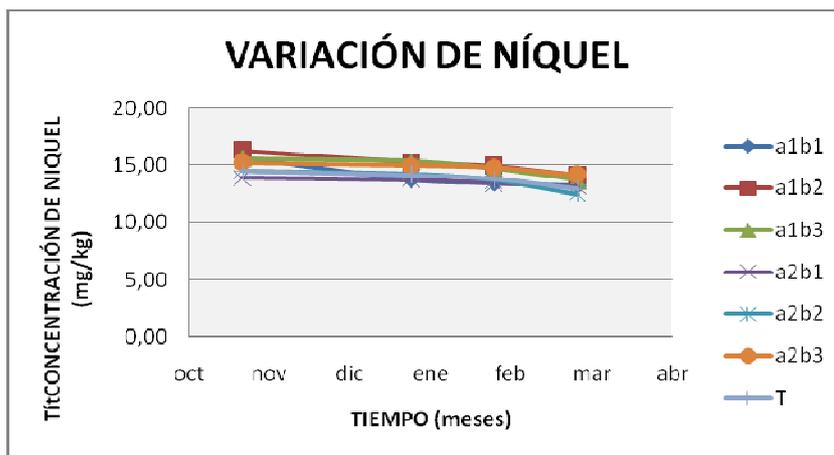
Los resultados de la concentración de Ni se presentan en el siguiente cuadro:

**Cuadro N° 11** Concentración de níquel (mg/Kg).

TRATAMIENTOS		Ni (mg/kg) / Tiempo (meses)			
		1	2	3	4
Compost 30%	a1b1	15,72	13,77	13,48	13,23
Compost 20%	a1b2	16,31	15,24	14,93	14,08
Compost 10%	a1b3	15,62	15,37	14,73	13,68
Bocashi 30%	a2b1	13,92	13,74	13,43	13,17
Bocashi 20%	a2b2	14,47	14,23	13,70	12,50
Bocashi 10%	a2b3	15,21	14,96	14,76	14,13
Testigo	T	14,49	14,16	13,81	12,90

La variación de níquel en función del tiempo de biorremediación se expresa en el gráfico siguiente:

**Gráfico N° 5.** Variación de níquel (mg/Kg) durante el proceso de biorremediación.



## TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Según el análisis estadístico para la variable respuesta Ni que se encuentra en el anexo C, al inicio de la biorremediación se evidencia efectos significativos del factor a sobre la concentración de níquel, es decir, que ésta no se ve afectada por la concentración de sustratos, pero si por el tipo de sustrato utilizado, siendo el bocashi con el que la concentración es menor. El coeficiente de variación indica una confiabilidad de los datos del 4.04 %.

Durante el segundo mes de biorremediación existe efectos significativos en cuanto al factor b, es decir que la disminución de la concentración de níquel no se ve afectada por la utilización de sustratos pero si por la concentración, siendo el mejor tratamiento el a2b1 (bocashi 30 %). La confiabilidad del los datos es de 3,90 %.

En el tercer mes la disminución del Níquel se hace más uniforme entre los tratamientos, manteniéndose el comportamiento al generar efectos significativos en la disminución de la concentración de níquel el factor b, siendo el mejor tratamiento el tratamiento a2b1, (bocashi 30%), con una confiabilidad de datos del 3,82 %.

Durante el cuarto mes no existen efectos significativos del factor a, factor b, su interacción y al comparar los tratamientos con el testigo, con un coeficiente de variación del 4,6 %. Estos resultados quieren decir que existe disminución de la concentración de níquel en todos los tratamientos a valores similares, y por tanto la aplicación de compost y bocashi en concentraciones del 30 %, 20 % y 10 % no genera cambios en el comportamiento de la concentración de níquel. Cuadro N° 12.

**Cuadro N° 12** Comparación múltiple de Tukey para níquel en el cuarto mes de biorremediación.

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN MEDIA DE Ni (mg/kg)	COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS
a2b3: 6	14,13	A
a1b2: 2	14,08	A
a1b3: 3	13,68	A
a1b1: 1	13,23	A
a2b2: 4	13,17	A
T: 7	12,90	A
a2b2: 5	12,50	A

#### 4.5.1.4 PLOMO (Pb)

Según el cuadro N° 13 y el gráfico N° 6:

La concentración de plomo del suelo al inicio del proceso de biorremediación (tiempo 1) se encuentra por debajo del límite permisible (< 100 mg/Kg) para suelo agrícola, RAOH, Decreto 1215. Existiendo diferencias en la concentración de plomo al iniciar el proceso de biorremediación siendo mayor esta concentración en el testigo esto debido a los diferentes procesos de inmovilización a los que están sujetos los metales pesados en el suelo arcilloso y por tanto las diferentes concentraciones de un lugar a otro en el mismo suelo, como lo establece Seoáñez (1999).

Durante el proceso de biorremediación del suelo (tiempo 2, 3, 4) existe disminución en la concentración de Pb incluyendo al testigo, por lo que la utilización de sustratos no afecta su comportamiento.

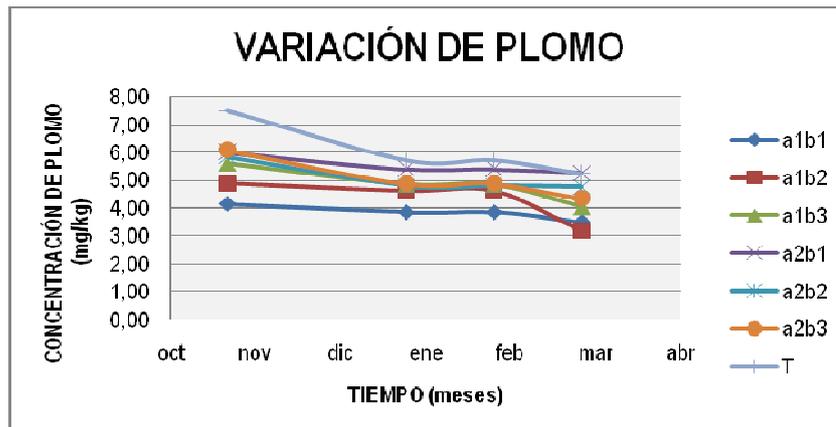
Los resultados de la concentración de Pb se presentan en el siguiente cuadro:

**Cuadro N° 13** Concentración de plomo (mg/Kg).

TRATAMIENTOS		Pb (mg/kg) / Tiempo (meses)			
		1	2	3	4
Compost 30%	a1b1	4,15	3,85	3,85	3,51
Compost 20%	a1b2	4,89	4,63	4,63	3,18
Compost 10%	a1b3	5,61	4,85	4,85	4,04
Bocashi 30%	a2b1	5,99	5,39	5,39	5,26
Bocashi 20%	a2b2	5,84	4,81	4,81	4,76
Bocashi 10%	a2b3	6,07	4,86	4,86	4,34
Testigo	T	7,49	5,71	5,71	5,25

La variación de plomo en función del tiempo de biorremediación se expresa en el siguiente gráfico:

**Gráfico N° 6.** Variación de plomo (mg/Kg) durante el proceso de biorremediación.



## TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Según el análisis estadístico para la variable respuesta Pb, existen efectos significativos en el inicio del proceso de biorremediación, para el factor a, b, su interacción y al comparar los tratamientos con el testigo, siendo así el sustrato con el que la concentración de plomo es menor es el a1 (compost) y el testigo es el que presenta una concentración mayor de plomo que los tratamientos. La confiabilidad de los datos es de 6,85%. Este comportamiento se mantiene durante el proceso de biorremediación.

Durante el segundo mes de biorremediación del suelo los efectos significativos son generados por el factor a, por la interacción axb y por la comparación de los tratamientos con el testigo, siendo el tratamiento a1b1 es el que presenta una menor concentración y el testigo mantiene la concentración más alta, con una confiabilidad de datos del 6,70 %. Este comportamiento se mantiene en el tercer mes de biorremediación con una confiabilidad del 7,47 %.

**Cuadro N° 14** Comparación múltiple de Tukey para plomo en el cuarto mes de biorremediación.

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN MEDIA DE PLOMO (mg/kg)	COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS
a2b1: 4	5,263	A
T: 7	5,247	A
a2b2: 5	4,763	AB
a2b3: 6	4,337	ABC
a1b3: 3	4,040	BCD
a1b1: 1	3,507	CD
a1b2: 2	3,183	D

Para el cuarto mes de biorremediación la disminución de la concentración de plomo se ve afectada significativamente por el factor a, la interacción axb y al comparar los tratamientos con el testigo. La confiabilidad de datos es del 9,25 %. El tratamiento con el que se obtiene la más baja concentración de plomo es el a1b1, cuadro N° 14, por lo tanto el sustrato con el que mayor es la disminución de plomo es el compost.

#### 4.5.2 VARIABLES CONTROL

##### 4.5.2.1 RECUENTO HETERÓTROFO EN PLACA (RHP)

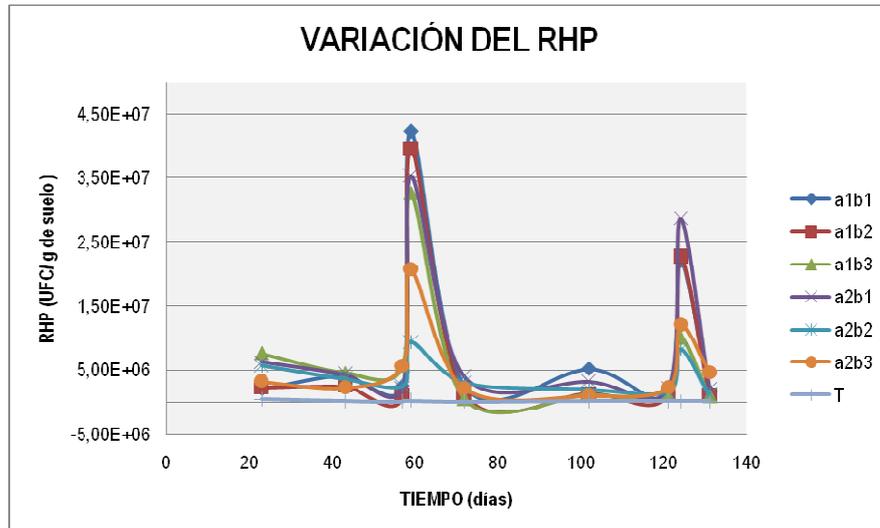
Los resultados del RHP se presentan en el siguiente cuadro:

**Cuadro N° 15** Control de RHP (UFC/g de suelo) durante el proceso de biorremediación.

TRATAMIENTOS		RHP (UFC/g de suelo) / Tiempo (días)								
		23	43	57	59	72	102	121	124	131
Compost 30%	a1b1	2,00E+06	4,10E+06	2,50E+06	4,20E+07	2,40E+06	5,10E+06	1,10E+06	2,20E+07	1,40E+06
Compost 20%	a1b2	2,20E+06	2,40E+06	9,30E+05	4,00E+07	1,10E+06	1,20E+06	1,10E+06	2,30E+07	9,00E+05
Compost 10%	a1b3	7,60E+06	4,50E+06	5,60E+06	3,30E+07	4,70E+05	1,10E+06	9,70E+05	1,00E+07	9,00E+05
Bocashi 30%	a2b1	6,20E+06	4,30E+06	2,20E+06	3,50E+07	3,90E+06	3,20E+06	2,10E+06	2,90E+07	2,10E+06
Bocashi 20%	a2b2	5,70E+06	3,60E+06	2,50E+06	9,30E+06	2,90E+06	1,90E+06	1,60E+06	8,20E+06	1,00E+06
Bocashi 10%	a2b3	3,20E+06	2,20E+06	5,70E+06	2,10E+07	2,00E+06	9,30E+05	2,20E+06	1,20E+07	4,70E+06
Testigo	T	3,70E+05	1,20E+05	9,00E+04	1,90E+05	4,00E+04	9,10E+04	8,90E+04	1,30E+05	9,50E+04

La variación del RHP en función del tiempo de biorremediación se expresa en el gráfico siguiente:

**Gráfico N° 7.** Variación de RHP (UFC/g de suelo) durante el proceso de biorremediación.



Según los resultados del cuadro N° 15 y el gráfico N° 7, los resultados del conteo de heterótrofos totales, demuestran que la aplicación de sustratos en el suelo mantuvo las poblaciones en  $10^5$  UFC/g, incluso con la bioestimulación. Al aplicar bioaumentación las poblaciones de bacterias heterótrofas se incrementan a una población de  $10^6$  UFC/g de suelo, para todos los tratamientos, siendo mayor este incremento en el compost, en mayor grado en las concentraciones 30 % y 20% que en la de 10 %. Para el tratamiento con Bocashi el número de poblaciones de heterótrofos totales se incrementó en mayor grado en las concentraciones 30 % y 10 % que en la de 20 %.

En el tratamiento testigo las poblaciones descendieron luego de la fase de acondicionamiento del suelo de  $48 \cdot 10^5$  UFC/g de suelo a un promedio de  $38 \cdot 10^4$  UFC/g de suelo y disminuyeron aun más durante el proceso de biorremediación al no estimular su crecimiento de forma alguna hasta poblaciones de  $95 \cdot 10^3$  UFC/g de suelo.

#### 4.5.2.2 TEMPERATURA DEL SUELO

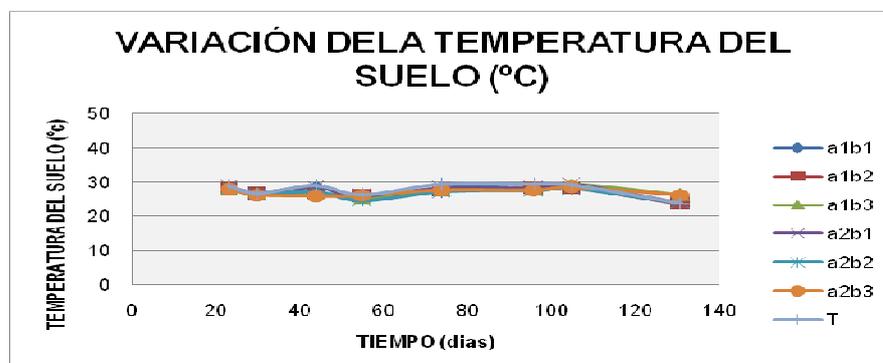
Los resultados de la temperatura del suelo se presentan en el siguiente cuadro:

**Cuadro N° 16** Control de temperatura del suelo (°C) durante el proceso de biorremediación.

TRATAMIENTOS		Temperatura del suelo (°C) / Tiempo (días)							
		23	30	44	55	74	96	105	131
Compost 30%	a1b1	28,57	26,29	28,57	25,27	28,30	28,30	28,73	24,00
Compost 20%	a1b2	28,37	26,60	26,83	25,93	27,53	28,40	28,37	23,77
Compost 10%	a1b3	28,11	26,66	27,10	25,27	27,67	27,97	29,31	26,43
Bocashi 30%	a2b1	28,77	26,99	28,50	26,13	28,27	28,27	29,40	24,07
Bocashi 20%	a2b2	28,44	26,52	27,27	24,60	27,17	27,60	28,13	24,00
Bocashi 10%	a2b3	27,86	26,31	26,07	26,23	27,63	27,63	28,43	26,27
Testigo	T	28,96	26,79	29,00	26,33	29,37	29,37	29,04	23,97

La variación de la temperatura del suelo en función del tiempo de biorremediación se expresa en el gráfico siguiente:

**Gráfico N° 8.** Variación de la temperatura del suelo (UFC/g de suelo) durante el proceso de biorremediación.



De acuerdo con los resultados que se encuentran en el cuadro N° 16 y el gráfico N° 8 la temperatura del suelo se mantuvo en un rango de 24 a 29 °C durante el proceso de biorremediación, en todos los tratamientos variando según las condiciones ambientales presentadas durante el ensayo experimental. Este rango se encuentra dentro de los valores normales para que los microorganismos mesofílicos se desarrollen y puedan llevar a cabo la degradación de los hidrocarburos, según Eweis (1999).

#### 4.5.2.3 pH DEL SUELO

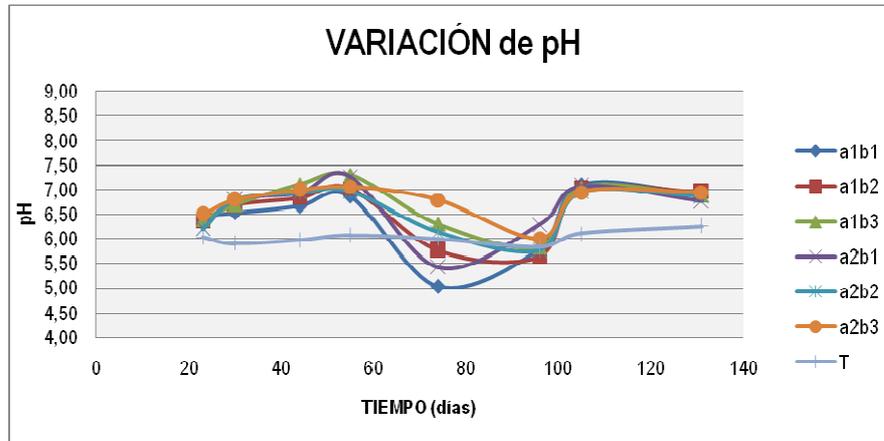
Los resultados del pH del suelo se presentan en el siguiente cuadro:

**Cuadro N° 17** Control de pH del suelo durante el proceso de biorremediación.

TRATAMIENTOS		pH del suelo / Tiempo (días)							
		23	30	44	55	74	96	105	131
Compost 30%	a1b1	6,50	6,53	6,67	6,87	5,03	5,80	7,09	6,92
Compost 20%	a1b2	6,37	6,69	6,83	7,03	5,77	5,65	7,02	6,95
Compost 10%	a1b3	6,40	6,70	7,10	7,30	6,30	5,83	7,04	6,89
Bocashi 30%	a2b1	6,20	6,80	6,93	7,27	5,42	6,01	7,07	6,77
Bocashi 20%	a2b2	6,20	6,80	6,93	6,97	6,13	5,77	6,95	6,87
Bocashi 10%	a2b3	6,50	6,80	7,00	7,06	6,79	6,29	6,95	6,95
Testigo	T	6,03	5,90	5,97	6,07	6,00	5,84	6,11	6,26

La variación del pH del suelo en función del tiempo de biorremediación se expresa en el gráfico siguiente:

**Gráfico N° 9.** Variación del pH del suelo durante el proceso de biorremediación.



Como puede observarse en el gráfico N° 9 y en el cuadro N° 17, el pH del suelo presentó variaciones durante el proceso de biorremediación, así tenemos:

Luego de 20 días de iniciado el proceso de biorremediación el suelo mantuvo el comportamiento ligeramente ácido (6 a 6,5) que presentó en su caracterización para todos los tratamientos. Luego de un mes de biorremediación el pH se estabilizó a neutro en un rango de (6,7 a 6,8), manteniendo este comportamiento hasta el segundo mes (6,8 a 7,3) en todos los tratamientos, durante las dos observaciones realizadas en este. Esta diferencia de pH se debe posiblemente al incremento de la capacidad tampón en el suelo, inducido por la aplicación de sustratos en el suelo, Suquilanda (1996).

Con la segunda aplicación de urea se produjo acidificación del suelo, debido a que la influencia residual del fertilizante tiende a bajar el pH de los suelos, Buckman (1985). El comportamiento fue diferente para los tratamiento así: desde fuertemente ácido (5,0 a 5,4) para el tratamiento a1b1 y a2b1, medianamente ácido (5,7) para el tratamiento a1b2, ligeramente ácido (6,1 a 6,3) para a1b3 y a2b2 a neutro (6,8) para a2b3, demostrando que la concentración de sustrato b3

(10%) reguló de mejor manera este cambio de pH. Luego de 20 días el pH se estabilizó en todos los tratamientos presentando un comportamiento medianamente ácido (5,7 a 6) a ligeramente ácido para el tratamiento a2b1 y a2b3 en un rango de (6 a 6,3). Debido a que el rango en el que se debe mantener el pH durante la aplicación de un tratamiento biológico es de 6 a 8, Eweis (1999), se aplicó encalado en las unidades experimentales para estabilizar el pH, logrando mantenerlo en neutro en los rangos de (6,8 a 7,0). Los testigos mantuvieron su pH como medianamente ácido (5,8 a 6,0) y para los dos últimos controles como ligeramente ácido (6,1 a 6,3). Su interpretación se realizó en base a la tabla N° I.

#### 4.5.2.4 TEMPERATURA Y HUMEDAD AMBIENTAL

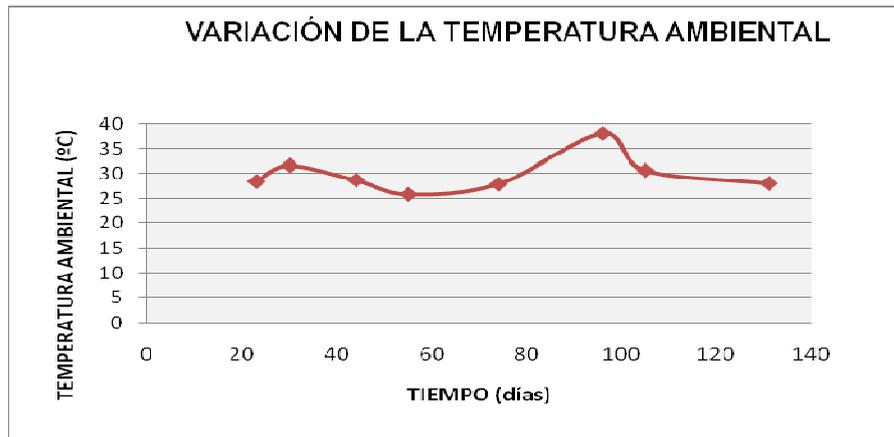
Los resultados de la temperatura y humedad ambiental se presentan en el siguiente cuadro:

**Cuadro N° 18** *Control de temperatura (°C) y humedad ambiental (%) durante el proceso de biorremediación en el área de experimentación.*

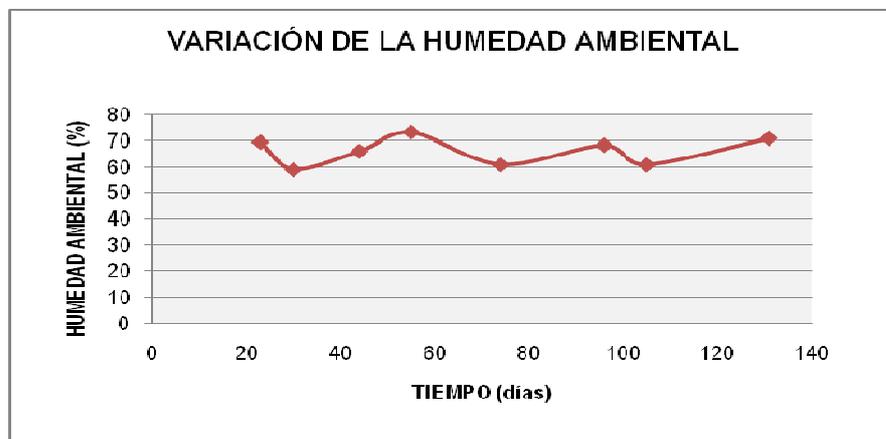
TIEMPO (Días)	HUMEDAD AMBIENTAL (%)	TEMPERATURA AMBIENTAL (°C)
23	69,40	28,46
30	59,02	31,65
44	66,00	28,75
55	73,14	25,88
74	60,90	30,13
96	68,29	38,06
105	60,86	30,67
131	70,86	28,08

La variación de la temperatura y humedad ambiental en función del tiempo de biorremediación se expresa en los gráficos N° 10 y N° 11:

**Gráfico N° 10.** Variación de la temperatura ambiental (°C) en el área de experimentación.



**Gráfico N° 11.** Variación de la humedad ambiental (%) en el área de experimentación.



Como se observa en el cuadro N° 18 y en gráfico N° 10, la temperatura ambiental en el área del ensayo experimental durante la biorremediación mantuvo un valor promedio de 30 °C y osciló en un rango 25 a 38 °C.

Como se observa en el cuadro N° 18 y en gráfico N° 11, la humedad ambiental mantuvo un valor promedio de 66 % variando en un rango de 59 a 71 %, valores que se encuentran dentro de los rangos establecidos para esta zona, según se determina el Estudio de Impacto Ambiental desarrollado por el PEPDA en el campo Sacha.

#### 4.6 RENDIMIENTO DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

Los resultados de rendimiento se enlistan en el siguiente cuadro:

**Cuadro N° 19** Resultados de rendimiento de cada tratamiento para las variables respuesta.

FACTOR A	FACTOR B	TRATAMIENTO	RENDIMIENTO (%)			
			TPH	Cd	Ni	Pb
a1	b1	a1b1	67,11	17,71	15,85	15,49
	b2	a1b2	62,30	35,04	13,69	34,96
	b3	a1b3	64,17	15,22	12,40	28,20
a2	b1	a2b1	72,37	8,86	5,41	12,20
	b2	a2b2	64,49	14,72	13,62	18,51
	b3	a2b3	65,82	2,90	7,10	28,56
TESTIGO		T	34,38	6,01	11,02	30,01

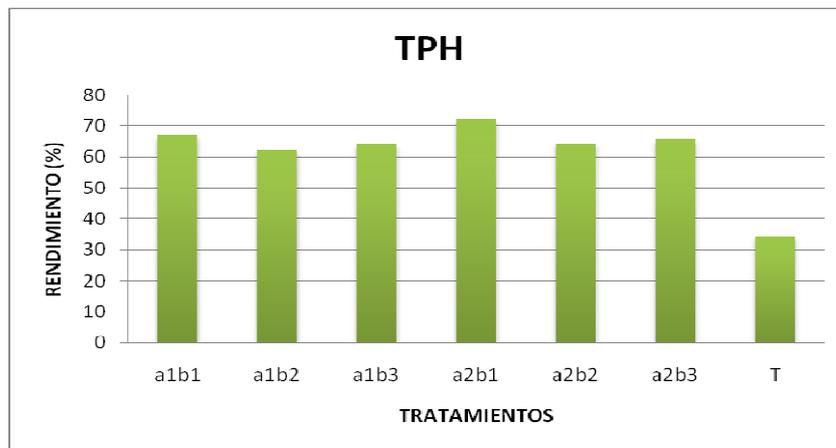
##### 4.6.1. HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO

De los resultados que se encuentran en el cuadro N° 19 se establece que el tratamiento con el rendimiento óptimo en la disminución de TPH es el a2b1 (Bocashi 30 %) con el 72 %. Los demás

tratamientos aplicados presentan un rendimiento más bajo entre 62,30 % y 67,11 %, no así el testigo cuya biorremediación por atenuación natural es del 34,38 %.

La variación en función del tiempo de biorremediación se expresa en el gráfico N° 12.

**Gráfico N° 12.** *Rendimiento de la biorremediación para TPH.*

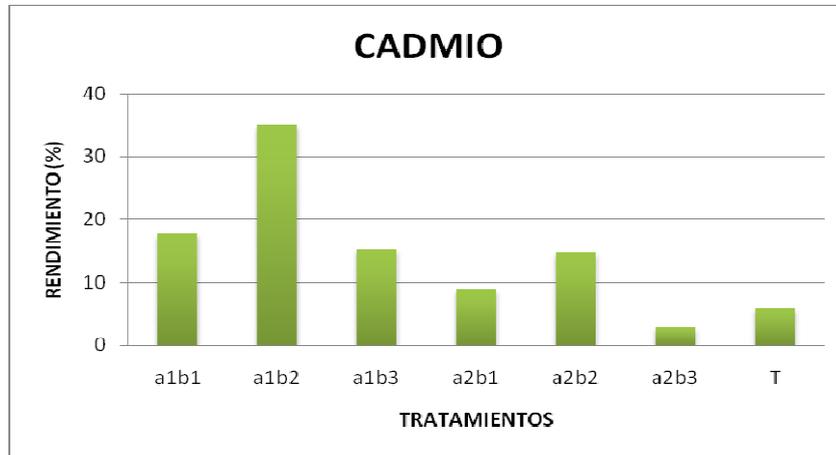


#### 4.6.2. METALES PESADOS

Se determinó según los resultados del Cuadro N° 19 que el tratamiento de mejor rendimiento en la disminución de cadmio es el a1b2 (Compost 20 %) con el 35 %. El tratamiento que presenta menor grado de degradación es el a2b3 (Bocashi 10 %), con un rendimiento de 2,9 %. Por atenuación natural el rendimiento en la disminución de la concentración de cadmio es del 6 %.

La variación en función del tiempo de biorremediación se expresa en el gráfico N° 13.

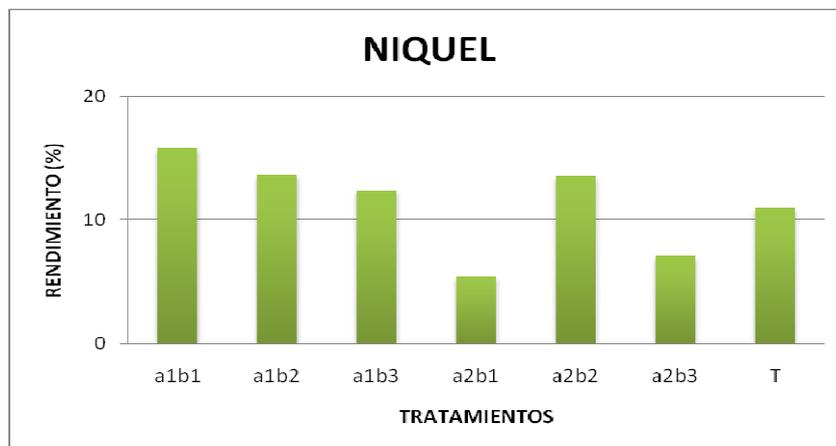
**Gráfico N° 13.** Rendimiento de la biorremediación para cadmio (2 meses).



Según los resultados del Cuadro N° 19 el tratamiento en el cual se logra el mejor rendimiento en la disminución del níquel es el a1b1 (Compost 30 %) con el 15,85 %. En el tratamiento testigo por atenuación natural el rendimiento es del 11 %.

La variación en función del tiempo de biorremediación se expresa en el gráfico N° 14.

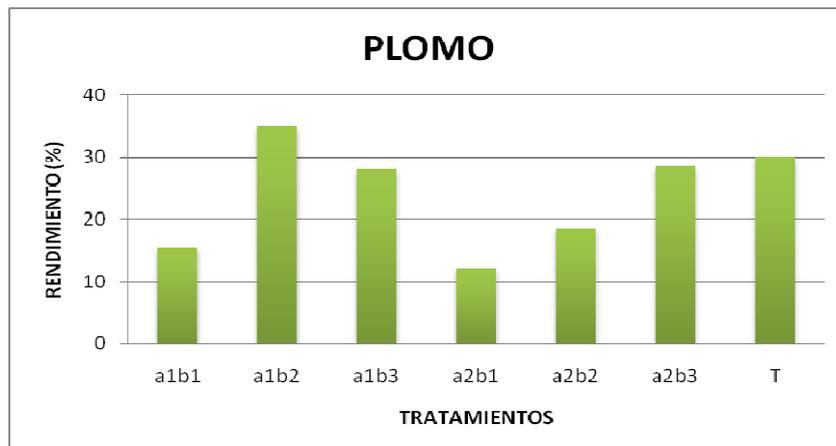
**Gráfico N° 14.** Rendimiento de la biorremediación para níquel



Según los resultados que se encuentran en el cuadro N° 19 el tratamiento en el cual se obtiene el mejor rendimiento en la disminución de la concentración de plomo durante el proceso de biorremediación del suelo con dos sustratos es el a1b2 (Compost 20 %) con un rendimiento del 34,96 %. Por atenuación natural el rendimiento en la concentración de plomo fue del 30 % por lo que al aplicar bocashi en el 30 %, 20 % y 10 % y compost en el 30 % y 10 % se obtiene un rendimiento menor al del testigo, por tanto fueron deficientes en la disminución de la concentración de plomo.

La variación en función del tiempo de biorremediación se expresa en el gráfico N° 15:

**Gráfico N° 15.** Rendimiento de la biorremediación para plomo.



El valor de TPH en todos los tratamientos utilizando Compost y Bocashi disminuye considerablemente durante los cuatros meses de biorremediación en un rango de 62,30 % – 72,37 % como se aprecia en el cuadro 19, además los valores de metales pesados, Cd, Ni, Pb que aunque se encuentran dentro de los límites permisibles para suelo agrícola disminuyen utilizando la técnica de Landfarming con bioestimulación y bioaumentación. Con este análisis se acepta la hipótesis nula planteada en la investigación.

# **CAPÍTULO V**

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. CONCLUSIONES

1. La elaboración de bocashi se efectuó en un tiempo de trece días, se obtuvo un producto de coloración grisácea, aspecto suelto y polvoso, con un contenido de 25,78 % de COT, 1,2 % de N, 1.903 mg/Kg de P, 2.876 mg/kg de K, un pH de 7,97 ligeramente alcalino, una densidad aparente de 190 Kg/m<sup>3</sup> y un contenido de 29\*10<sup>6</sup> UFC/ g de suelo.
2. Los sustratos orgánicos Compost y Bocashi presentan características fisicoquímicas y microbiológica (RHP) aceptables para ser empleados como acondicionadores del suelo para biorremediación por Landfarming.
3. La caracterización del suelo demuestra que se encuentra un estado degradado, con un contenido de 4.208 mg/kg de TPH superior al límite permisible y 0,46 mg/kg de Cd, 14,17 mg/kg de Ni y 4,46 mg/kg de Pb, metales pesados que se encuentran bajo los límites permisibles del RAOH, decreto 1215.
4. El recuento de bacterias heterótrofas totales en el suelo contaminado con hidrocarburos se mantuvo en el orden de 10<sup>5</sup> UFC/g de suelo al aplicarse el proceso de biorremediación con compost y bocashi.

5. Aplicando el proceso de biorremediación con landfarming durante cuatro meses y medio se logró disminuir en todos los tratamientos la concentración de TPH en un rango del 62,30 % - 72,37 %. Metales pesados en un rango de: Cadmio 2,90 % - 35,04 %; Níquel 5,41 % - 15,85 % y Plomo 12,20 % - 34,96 %, todos por debajo de los límites permisibles para uso en suelos agrícolas, RAOH, decreto 1215.
6. El mejor sustrato para biorremediar TPH en la presente investigación es el Bocashi, con el tratamiento a2b1 (bocashi 30 %) con el 72,37 % de rendimiento aunque estadísticamente no existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos aplicados con compost y bocashi.
7. El mejor sustrato para biorremediar metales pesados lo presenta el Compost ya que técnicamente presenta el mejor rendimiento para Cadmio el tratamiento a1b2 (Compost 20 %) con el 35,04 %; Níquel el tratamiento a1b1 (Compost 30 %) con el 15,85 %; y Plomo el tratamiento a1b2 (Compost 20 %) con el 34,96 %.
8. Los sustratos Bocashi y Compost no presentan diferencias significativas en el proceso de descontaminación por lo cual son aptos para ser utilizados para biorremediar hidrocarburos por la técnica de landfarming.

## 5.2. RECOMENDACIONES

1. Elaborar los sustratos orgánicos en un área física adecuada que cumpla con los requisitos indispensables como lo es: la cubierta, sistema de recolección de lixiviados y sistemas de impermeabilización del suelo para obtener un producto de calidad.
2. En la elaboración de Bocashi utilizar materiales fácilmente degradables para evitar que en el producto final exista material sin descomponer.
3. Durante el proceso de biorremediación del suelo por landfarming es indispensable estimular el crecimiento de los microorganismos mediante el control de variables abióticas principalmente la provisión de agua mediante la humectación, el oxígeno mediante aireación, ya que éste es el aceptor de electrones en el proceso aerobio, llevado a cabo por bacterias y el adecuado suministro de nutrientes.
4. Llevar el control adecuado del pH del suelo para intervenir en el caso de procesos de acidificación del suelo y de la humedad del suelo para impedir un proceso anaerobio ya que las poblaciones de microorganismos pueden disminuir.
5. Al aplicar el proceso de bioestimulación y bioaugmentación seguir las normas básicas de seguridad para evitar problemas sanitarios y/o accidentes.

# **CAPÍTULO VI**

## **CAPÍTULO VI**

### **RESUMEN**

El objetivo de la presente investigación fue evaluar dos sustratos orgánicos en la técnica de landfarming para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, como una alternativa para su tratamiento por la presencia de pasivos ambientales como piscinas con desechos hidrocarburíferos, generadas durante el desarrollo de la Industria Hidrocarburífera en el Ecuador. Realizada en el PEPDA, Campo Sacha de PETROPRODUCCIÓN.

Los materiales empleados fueron dos sustratos orgánicos (compost y bocashi) en concentraciones del 30%, 20% y 10% (V/V) y 0,03m<sup>3</sup> por unidad experimental de suelo contaminado con 4.208 mg/Kg de TPH superior al límite permisible y 0,46 mg/kg de Cd, 14,17 mg/kg de Ni y 4,46 mg/kg de Pb, metales pesados que se encuentran bajo el límite permisible para suelo agrícola, según el RAOH, decreto 1215, a través de un diseño factorial a x b de siete tratamientos, aplicando la técnica de landfarming con bioestimulación y bioaumentación de bacterias nativas degradadoras de hidrocarburos, efectuando el monitoreo de las variables respuesta y control durante los cuatro meses de biorremediación. Mediante este proceso se logró disminuir la concentración de TPH por debajo de dicho límite, en un rango del 62,30% a 72,37%, que estadísticamente no presenta diferencias significativas durante los cuatro meses de biorremediación, por lo que el compost y el bocashi en el 30%, 20% y 10% son aptos para ser utilizados en la técnica de landfarming para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

## SUMARY

This investigation deals with the evaluation of two organic substrates in the landfarming technique for the bioremediating of soils polluted with hydrocarbides as an alternative for their treatment for the presence of environmental passive facts such as pools with hydrocarbon wastes, generated during the development of the hydrocarbon industry in Ecuador. This research was carried out in PEPDA, Sacha Field of PETROPRODUCCION.

The materials consisted of two organic substrates (compost and bocashi) at 30%, 20% and 10% (V/V) concentrations and 0,03 m<sup>3</sup> per experimental unit of soil polluted with 4.208 mg/Kg TPH superior to the permissible limit and 0,46 mg/kg Cd, 14,17 mg/kg Ni and 4,46 mg/kg Pb, heavy metals which are below the permissible limit for a farming soil, according to RAOH, decree 1215, through a factorial design a x b of seven treatments, applying the landfarming technique with biostimulation and bioaugmentation of degradating native bacteria of hydrocarbides, carrying out variable, response and control monitoring during the four months of bioremediating. Through this process it was possible to diminish the TPH concentration below such a limit at a 62,30 % - 72,37% range which does not show significant differences during the four months of bioremediating. Compost and Bocashi at 30%, 20% and 10% are suitable to be used in the landfarming technique for the bioremediating of soils polluted with hydrocarbides.

# **CAPÍTULO VII**

## CAPÍTULO VII

### BIBLIOGRAFÍA

1. ATLAS, R., BARTHA, R. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. 2ª.ed. Madrid: Pearson Educación, 2002. pp. 217, 218 - 255, 360, 553-586.
2. BENZINA, A. Agricultura Orgánica: Fundamentos para la Región Andina. Alemania: Neckar-Verlang, 2001. pp. 49.
3. BUCKMAN, H. Naturaleza y Propiedades de los Suelos. 5ª.ed. México: Limusa, 1985. pp. 12, 52-56, 74-80, 104, 375
4. EWEIS, J., ERGAS, S., CHANG, D., SCHROEDER, E. Principios de Biorrecuperación. Madrid: Mc Graw-Hill/Interamericana, 1999. pp. 2, 27-31,37,38,41,65,132
5. ECUADOR; MINISTERIO DE ENERGÍA Y MINAS, SUBSECRETARIA DE PROTECCIÓN AMBIENTAL. Reglamento Sustitutivo del Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador. Quito: Horizont 3000, 2001. pp. 112.
6. ECUADOR; MINISTERIO DE ENERGÍA Y MINAS. Texto Unificado de Legislación Ambiental. TULAS, libro VI, anexo 2. pp. 350, 369.

7. GORTAIRE, R. Evaluación de Bocashi y la Turba como Materiales de Soporte para Rhizobium sp. TESIS Ing. Agrónomo. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Fac. de Recursos Naturales, Esc. de Ingeniería Agronómica, 2002. pp. 18.
8. MORRIS, L., MICHAEL, G. Biotratamiento de Residuos Tóxicos y Peligrosos. Madrid: Mc Graw-Hill, 1997. pp. 7, 222 – 223.
9. PETROECUADOR. PROYECTO ELIMINACION DE PISICNAS CONTAMINADAS Y LIMPIEZA DE DERRAMNES, D.A. Estudio de Impacto Ambiental. Campo Sacha, Mayo del 2006. (documento).
10. PETROECUADOR. PROYECTO ELIMINACIÓN DE PISICNAS CONTAMINADAS Y LIMPIEZA DE DERRAMNES, D.A. Tratamiento Biológico de Suelos Contaminados con Hidrocarburos- LACIB. Campo sachá, 2008. (documento).
11. RITTMANN, B., MCCARTY, P. Biotecnología del Medio Ambiente. Madrid: Mc Graw-Hill/ Interamericana, 2001. pp. 642, 677.
12. SEOÁNEZ, M. Contaminación del Suelo: estudios tratamiento y gestión. Madrid: Mundi-Prensa, 1999. pp. 170-181.
13. SUQUILANDA, M. Agricultura Orgánica. Quito: UPS, 1996. pp. 101-182.

## INTERNET

14. Abonos Verdes.

<http://www.infoagro.go.cr/organico/4.%20Bocashi.htm>

20070712.

15. AGENCIA PARA SUSTANCIAS TÓXICAS Y REGISTRO DE ENFERMEDADES.

Hidrocarburos Totales de Petróleo. 1999.

<http://www.atsdr.cdc.gov/ec>.

20071112.

16. ARAUJO, I., ANGULO, N. Centro de Investigaciones Biológicas. Biorremediación de suelos con consorcio bacteriano, compostaje y fertilización. Venezuela, 2004.

(documento PDF)

20070712.

17. AVENDAÑO, D. El Proceso del Compostaje. Chile, 2003. (documento PDF)

20070712

18. Bocashi.

<http://www.cyberolimpiadas.com.sv/proyectos/celasmesitas/abonos/bocashi.htm>

20070712.

19. CAMPIRANO. Abono Orgánico Fermentado Tipo Bocashi. Zacatecas, 2006.

[http://www.oedrusacatecas.gob.mx/oedrus\\_zac/zacatecas/AbonosFermentados](http://www.oedrusacatecas.gob.mx/oedrus_zac/zacatecas/AbonosFermentados).

20070712.

20. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Landfarming.

<http://www.epa.gov/oust/cat/landfarm.htm>.

20070312.

21. Fertilizante Bocashi.

<http://www.anam.gob.pa/PROCCAPAWEB/Spanish/Tech/Bocashi/Bocashi.htm>

20070712.

22. FLACSO. Petróleo y Desarrollo sostenible. Quito, 2000. (documento PDF)

20070325.

23. Generalidades de los microorganismos taxonomía. Modulo II, 2006.

<http://mail.fq.edu.uy/~microbio/modulo2/Ciclopractico06.doc>

20071112.

24. INFOAGRO. Tipos de sustratos de cultivo.

[http://www.infoagro.com/industria\\_auxiliar/tipo\\_sustratos2](http://www.infoagro.com/industria_auxiliar/tipo_sustratos2).

20070325.

25. INGENIERÍA AMBIENTAL & MEDIO AMBIENTE. El Suelo.2000.

<http://www.fortunecity.es/expertos/profesor/171/suelos.html>

20070325.

26. PARDO, J. Efecto de la Adición de Fertilizantes Inorgánicos Compuestos en la Degradación de Hidrocarburos en Suelos Contaminados con Petróleo. Bogotá, 2004. pp. 40- 49. (documento PDF)  
20070312.
27. PEPDA  
<http://www.proteccionambiental.org/site/pepda.htm>  
20071112.
28. Producción de abonos orgánicos. (documento PDF).  
20070712
29. RAMIREZ, R., RESTREPO, R. Evaluación de la Aplicación del Abono Tipo Bocashi en las Propiedades Físicas de un Suelo Degradado del Municipio de Marinilla, Antioquia. (documento PDF)  
20070312.
30. UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAISO. Chile.  
[http://ucv.altavoz.net/prontus\\_unidacad/site/artic/20061121/html](http://ucv.altavoz.net/prontus_unidacad/site/artic/20061121/html)  
20080112.
31. VALLEJO, V., SALGADO, L., ROLDAN, F. Evaluación de la Bioestimulación en la Biodegradación de TPH en Suelos Contaminados con Petróleo. Revista Colombiana. Biotecnología. Colombia. 7(2): 67-78. 2005. (documento PDF)  
20070312.

# **CAPÍTULO VIII**

## CAPÍTULO VIII

### ANEXOS

#### ANEXO A: RESULTADOS

**Cuadro N° 20** *Porcentaje de nitrógeno de los materiales usados en el bocashi.*

N°	MATERIALES	% DE NITRÓGENO
1	Cascarilla de arroz	0,50
2	Tamo de café	1,76
3	Ceniza de cascarilla de arroz	0,35
4	Estiércol	1,27
5	Gallinaza	2,40
6	Canavalia	4,46
7	Flemigia	2,95

## ANEXO B: TABLAS ADICIONALES

**Tabla VI.** *Composición del Agar Nutritivo, DIFCO, TM*

Base para el cultivo de una amplia variedad de microorganismos,  
Suspensión de 23g de agar nutritivo en 1L de agua purificada,  
pH, final  $6,8 \pm 0, 2$ , Higroscópico

FORMULA APROXIMADA*POR LITRO	CANTIDADES
Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Agar	15,0 g

**Tabla VII.** *Formula de Medio Mineral para 1L pH 7*

REACTIVOS	CANTIDADES (g/L)
Cloruro de amonio	1,2g
Cloruro de Calcio.	0,000504 g
Fosfato Monobásico de Potasio tri hidratado	0,3578 g
Fosfato acido de Potasio tri hidratado	0,4960g
Nitrato de Potasio	2,4 g
Sulfato de Magnesio hepta hidratado.	2,04 g
Sulfato de Sodio	2,4 g
Sulfato de hierro Hepta hidratado.	0,02 g
Hidrocarburo	5% V/V
Extracto de lavadura	4 g
Peptona Bacteriológica	2 g

**Fuente:** LACIB (2008)

## ANEXO C: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA TPH

Title: TESIS

Function: FACTOR

Experiment Model Number 1.

Two Factor Completely Randomized Design

Data case N°: 1 to 18.

Factorial ANOVA for the factors:

- Replication (Var 1: REPLICAS) with values from 1 to 3
- Factor A (Var 2: FACTOR A) with values from 1 to 2
- Factor B (Var 3: FACTOR) with values from 1 to 3

Function: ANOVA-1

Data case no. 1 to 21

One way ANOVA grouped over variable 2 (tratamientos)  
with values from 1 to 7.

#### Variable 4: TPH1

#### ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

<b>FV</b>	<b>gl</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>F.05</b>	<b>F.01</b>
<i>Factor B</i>	2	122901,444	61450,722	0,93	3,74	6,51
<i>A*B</i>	2	67515,444	33757,722	0,51	3,74	6,51
<i>testigo vs Resto</i>	1	336287,176	336287,176	5,10	4,60	8,86
<i>Error</i>	14	922.806	65914,714			
<i>TOTAL</i>	20	1464532,286				

Coefficient of Variation: 6.05%

#### PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE TUKEY PARA TPH1

Title: TESIS

Function: RANGE

Error Mean Square= 65914.714

Error Degrees of Freedom = 14  
 No. of observations to calculate a mean = 3  
 Tukey's Honestly Significant Difference Test  
 $s_{\bar{y}} = 4687$  at  $\alpha = 0.050$

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 4258. A	Mean 7 = 4557. A
Mean 2 = 4100. A	Mean 6 = 4322. A
Mean 3 = 4294. A	Mean 3 = 4294. A
Mean 4 = 4045. A	Mean 1 = 4258. A
Mean 5 = 4130. A	Mean 5 = 4130. A
Mean 6 = 4322. A	Mean 2 = 4100. A
Mean 7 = 4557. A	Mean 4 = 4045. A

=====

**Variable 5: TPH2**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE						
FV	gl	SC	CM	F	F.05	F.01
<i>Factor A</i>	1	59627,556	59627,556	1,10	4,60	8,86
<i>Factor B</i>	2	104235,444	52117,722	0,96	3,74	6,51
<i>A*B</i>	2	151142,111	75571,0555	1,40	3,74	6,51
<i>testigo vs Resto</i>	1	1356998,222	1356998,222	25,11	4,60	8,86
<i>Error</i>	14	756535,333	54038,238			
<i>TOTAL</i>	20	2428538,666				

Coefficient of Variation: 5.14%

**PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE TUKEY PARA TPH2**

Title: TESIS

Function: RANGE¶

Error Mean Square = 54038.  
 Error Degrees of Freedom= 14  
 No. of observations to calculate a mean= 3

Tukey's Honestly Significant Difference Test

$s_{\bar{y}} = 134.2$  at  $\alpha = 0.050$

Original Order		Ranked Order	
Mean 1 = 3602.	B	Mean 7 = 4384.	A
Mean 2 = 3422.	B	Mean 4 = 3834.	AB
Mean 3 = 3777.	AB	Mean 3 = 3777.	AB
Mean 4 = 3834.	AB	Mean 5 = 3679.	B
Mean 5 = 3679.	B	Mean 6 = 3634.	B
Mean 6 = 3634.	B	Mean 1 = 3602.	B
Mean 7 = 4384.	A	Mean 2 = 3422.	B

=====

**Variable 6: TPH3**

**ANALYSIS OF VARIANCE TABLE**

FV	gl	SC	CM	F	F.05	F.01
Factor A	1	24420,5	24420,5	0,28	4,60	8,86
Factor B	2	1157050,333	578525,1665	6,52	3,74	6,51
A*B	2	496263	248131,5	2,80	3,74	6,51
testigo vs Resto	1	8078801,786	8078801,786	91,06	4,60	8,86
Error	14	1242095,333	88721,095			
TOTAL	20	10998630,95				

Coefficient of Variation: 13.48%

**PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE TUKEY PARA TPH3**

Title: TESIS

Function: RANGE¶

Error Mean Square = 88721.095

Error Degrees of Freedom = 14

No. of observations to calculate a mean = 3

Tukey's Honestly Significant Difference Test

$s_{\bar{y}} = 172.0$  at  $\alpha = 0.050$

Original Order		Ranked Order	
Mean 1 =	1858. BC	Mean 7 =	3730. A
Mean 2 =	1947. BC	Mean 5 =	2237. B
Mean 3 =	2177. BC	Mean 6 =	2178. B
Mean 4 =	1346. C	Mean 3 =	2177. BC
Mean 5 =	2237. B	Mean 2 =	1947. BC
Mean 6 =	2178. B	Mean 1 =	1858. BC
Mean 7 =	3730. A	Mean 4 =	1346. C

=====

**Variable 7: TPH4**

**ANALYSIS OF VARIANCE TABLE**

<b>FV</b>	<b>gl</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>F.05</b>	<b>F.01</b>
<i>Factor A</i>	1	87501,389	87501,389	1,26	4,60	8,86
<i>Factor B</i>	2	260247	130123,5	1,88	3,74	6,51
<i>A*B</i>	2	44436,778	22218,389	0,32	3,74	6,51
<i>testigo vs Resto</i>	1	6269868,643	6269868,643	90,38	4,60	8,86
<i>Error</i>	14	971249,333	69374,952			
<i>TOTAL</i>	20	7633303,143				

Coefficient of Variation: 15.92%

**PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE TUKEY PARA TPH4**

Title: TESIS

Function: RANGE¶

Error Mean Square= 69374.

Error Degrees of Freedom = 14

No. of observations to calculate a mean = 3

Tukey's Honestly Significant Difference Test

$s_ = 152.1$  at  $\alpha = 0.050$

Original Order		Ranked Order	
Mean 1 =	1401. B	Mean 7 =	2993. A
Mean 2 =	1555. B	Mean 2 =	1555. B
Mean 3 =	1548. B	Mean 3 =	1548. B
Mean 4 =	1122. B	Mean 6 =	1492. B
Mean 5 =	1471. B	Mean 5 =	1471. B
Mean 6 =	1492. B	Mean 1 =	1401. B
Mean 7 =	2993. A	Mean 4 =	1122. B

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA CADMIO

Title: TESIS

Function: FACTOR

Experiment Model Number 1:  
Two Factor Completely Randomized Design

Data case no. 1 to 18.

Factorial ANOVA for the factors:  
Replication (Var 1: repeticiones) with values from 1 to 3  
Factor A (Var 2: a) with values from 1 to 2  
Factor B (Var 3: b) with values from 1 to 3

Function: ANOVA-1  
Data case no. 1 to 21

One way ANOVA grouped over variable 2 (tratamientos)  
with values from 1 to 7.

#### Variable 4:Cd1

#### ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

<b>FV</b>	<b>gl</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>F.05</b>	<b>F.01</b>
<i>Factor A</i>	1	0	0	0,00	4,60	8,86
<i>Factor B</i>	2	0,003	0,0015	10,50	3,74	6,51
<i>A*B</i>	2	0,003	0,0015	10,50	3,74	6,51
<i>testigo vs Resto</i>	1	0,001	0,001	7,00	4,60	8,86
<i>Error</i>	14	0,002	1,43E-04			
<i>TOTAL</i>	20	0,007				

Coefficient of Variation: 2.35%

#### PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE TUKEY PARA Cd1

Title: TESIS

Function: RANGE¶

Error Mean Square = 0.0001430  
 Error Degrees of Freedom = 14  
 No. of observations to calculate a mean = 3

Tukey's Honestly Significant Difference Test  
 $s_{\bar{y}} = 0.006904$  at  $\alpha = 0.050$

Original Order		Ranked Order	
Mean 1 = 0.4300	B	Mean 2 = 0.4933	A
Mean 2 = 0.4933	A	Mean 3 = 0.4600	AB
Mean 3 = 0.4600	AB	Mean 6 = 0.4600	AB
Mean 4 = 0.4500	B	Mean 5 = 0.4533	B
Mean 5 = 0.4533	B	Mean 4 = 0.4500	B
Mean 6 = 0.4600	AB	Mean 7 = 0.4433	B
Mean 7 = 0.4433	B	Mean 1 = 0.4300	B

=====

**Variable 5: cad2**

**ANALYSIS OF VARIANCE TABLE**

<b>FV</b>	<b>gl</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>F.05</b>	<b>F.01</b>
<i>Factor A</i>	1	0,017	0,0170	79,33	4,60	8,86
<i>Factor B</i>	2	0,014	0,0070	32,67	3,74	6,51
<i>A*B</i>	2	0,000	0,0000	0,00	3,74	6,51
<i>testigo vs Resto</i>	1	0,003	0,0030	14,00	4,60	8,86
<i>Error</i>	14	0,003	2,14E-04			
<i>TOTAL</i>	20	0,037				

Coefficient of Variation: 3.54%

**PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE TUKEY PARA Cd2**

Title: TESIS

Function: RANGE¶  
 Error Mean Square = 0.0002140  
 Error Degrees of Freedom = 14  
 No. of observations to calculate a mean = 3

Tukey's Honestly Significant Difference Test

s\_ = 0.008446 at alpha = 0.050

Original Order			Ranked Order		
Mean 1 = 0.3533	CD		Mean 6 = 0.4467	A	
Mean 2 = 0.3200	D		Mean 7 = 0.4167	AB	
Mean 3 = 0.3900	BC		Mean 4 = 0.4100	B	
Mean 4 = 0.4100	B		Mean 3 = 0.3900	BC	
Mean 5 = 0.3867	BC		Mean 5 = 0.3867	BC	
Mean 6 = 0.4467	A		Mean 1 = 0.3533	CD	
Mean 7 = 0.4167	AB		Mean 2 = 0.3200	D	

Variable 6: cad3

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

FV	gl	SC	CM	F	F.05	F.01
Factor A	1	0,000	0,000	0,00	4,60	8,86
Factor B	2	0,000	0,000	0,00	3,74	6,51
A*B	2	0,000	0,000	0,00	3,74	6,51
testigo vs Resto	1	0,000	0,000	0,00	4,60	8,86
Error	14	0,000	0,000			
TOTAL	20	0,000				

Coefficient of Variation: 1.33%

Variable 7: cad4

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

FV	gl	SC	CM	F	F.05	F.01
Factor A	1	0,000	0,000	0,00	4,60	8,86
Factor B	2	0,000	0,000	0,00	3,74	6,51
A*B	2	0,000	0,000	0,00	3,74	6,51
testigo vs Resto	1	0,000	0,000	0,00	4,60	8,86
Error	14	0,000	0,000			
TOTAL	20	0,000				

Coefficient of Variation: 0,00%

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA NIQUEL

Title: TESIS

Function: FACTOR

Experiment Model Number 1:  
Two Factor Completely Randomized Design

Data case no. 1 to 18.

Factorial ANOVA for the factors:

- Replication (Var 1: repeticiones) with values from 1 to 3
- Factor A (Var 2: a) with values from 1 to 2
- Factor B (Var 3: b) with values from 1 to 3

Title: TESIS

Function: ANOVA-1  
Data case no. 1 to 21

One way ANOVA grouped over variable 2 (TRATAMIENTOS)  
with values from 1 to 7.

### Variable 4: Ni 1

ANÁLISIS OF VARIANCE TABLE						
FV	gl	SC	CM	F	F.05	F.01
<i>Factor A</i>	1	8,174	8,174	21,91	4,60	8,86
<i>Factor B</i>	2	1,355	0,678	1,82	3,74	6,51
<i>A*B</i>	2	1,994	0,997	2,67	3,74	6,51
<i>testigo vs Resto</i>	1	1,320	1,320	3,54	4,60	8,86
<i>Error</i>	14	5,222	0,373			
<i>TOTAL</i>	20	18,065				

Coefficient of Variation: 4.04%

### PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE TUKEY PARA Ni 1

Title: TESIS

Function: RANGE¶

Error Mean Square = 0.3730  
 Error Degrees of Freedom = 14  
 No. of observations to calculate a mean = 3

Tukey's Honestly Significant Difference Test  
 $s_{\bar{y}} = 0.3531$  at  $\alpha = 0.050$

Original Order			Ranked Order		
Mean 1 =	15.72	AB	Mean 2 =	16.31	A
Mean 2 =	16.31	A	Mean 1 =	15.72	AB
Mean 3 =	15.62	ABC	Mean 3 =	15.62	ABC
Mean 4 =	13.93	C	Mean 6 =	15.21	ABC
Mean 5 =	14.47	BC	Mean 7 =	14.50	BC
Mean 6 =	15.21	ABC	Mean 5 =	14.47	BC
Mean 7 =	14.50	BC	Mean 4 =	13.93	C

=====

**Variable 5: Ni 2**

**ANALYSIS OF VARIANCE TABLE**

<b>FV</b>	<b>gl</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>F.05</b>	<b>F.01</b>
<i>Factor A</i>	1	1,046	1,046	3,42	4,60	8,86
<i>Factor B</i>	2	6,263	3,132	10,23	3,74	6,51
<i>A*B</i>	2	0,739	0,370	1,21	3,74	6,51
<i>testigo vs Resto</i>	1	0,394	0,394	1,29	4,60	8,86
<i>Error</i>	14	4,284	0,306			
<b>TOTAL</b>	<b>20</b>	<b>12,726</b>				

Coefficient of Variation: 3,90%

**PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE TUKEY PARA Ni 2**

Title: TESIS

Function: RANGE¶

Error Mean Square = 0.306  
 Error Degrees of Freedom = 14  
 No. of observations to calculate a mean = 3

Tukey's Honestly Significant Difference Test  
 $s_ = 0.3194$  at  $\alpha = 0.050$

Original Order		Ranked Order	
Mean 1 =	13.77 B	Mean 3 =	15.37 A
Mean 2 =	15.24 AB	Mean 2 =	15.24 AB
Mean 3 =	15.37 A	Mean 6 =	14.96 AB
Mean 4 =	13.74 B	Mean 5 =	14.23 AB
Mean 5 =	14.23 AB	Mean 7 =	14.16 AB
Mean 6 =	14.96 AB	Mean 1 =	13.77 B
Mean 7 =	14.16 AB	Mean 4 =	13.74 B

=====

**Variable 6: Ni 3**

**ANALYSIS OF VARIANCE TABLE**

FV	gl	SC	CM	F	F.05	F.01
Factor A	1	0,773	0,773	3,05	4,60	8,86
Factor B	2	5,180	2,590	10,22	3,74	6,51
A*B	2	1,501	0,751	2,96	3,74	6,51
testigo vs Resto	1	0,328	0,328	1,29	4,60	8,86
Error	14	3,549	0,254			
TOTAL	20	11,331				

Coefficient of Variation: 3.82%

**PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE TUKEY PARA Ni 3**

Title: TESIS

Function: RANGE

Error Mean Square = 0.2540

Error Degrees of Freedom = 14

No. of observations to calculate a mean = 3

Tukey's Honestly Significant Difference Test

$s_ = 0.2910$  at  $\alpha = 0.050$

Original Order		Ranked Order	
.Mean 1 =	13.48 AB	Mean 2 =	14.93 A
Mean 2 =	14.93 AB	Mean 6 =	14.76 AB
Mean 3 =	14.73 A	Mean 3 =	14.73 AB
Mean 4 =	13.43 B	Mean 7 =	13.81 AB
Mean 5 =	13.70 AB	Mean 5 =	13.70 AB
Mean 6 =	14.76 AB	Mean 1 =	13.48 AB
Mean 7 =	13.81 AB	Mean 4 =	13.43 B

=====

**Variable 7: Ni 4**

**ANALYSIS OF VARIANCE TABLE**

<b>FV</b>	<b>gl</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>F.05</b>	<b>F.01</b>
<i>Factor A</i>	1	0,708	0,708	1,87	4,60	8,86
<i>Factor B</i>	2	1,784	0,892	2,36	3,74	6,51
<i>A*B</i>	2	3,346	1,673	4,42	3,74	6,51
<i>testigo vs Resto</i>	1	0,805	0,805	2,13	4,60	8,86
<i>Error</i>	14	5,300	0,379			
<i>TOTAL</i>	20	11,943				

Coefficient of Variation: 4,60%

**PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE TUKEY PARA Ni 4**

Title: TESIS

Function: RANGE¶

Error Mean Square = 0.3785

Error Degrees of Freedom = 14

No. of observations to calculate a mean = 3

Tukey's Honestly Significant Difference Test

$s_ = 0.3552$  at  $\alpha = 0.050$

Original Order			Ranked Order		
Mean	1 =	13.23 A	Mean	6 =	14.13 A
Mean	2 =	14.08 A	Mean	2 =	14.08 A
Mean	3 =	13.68 A	Mean	3 =	13.68 A
Mean	4 =	13.17 A	Mean	1 =	13.23 A
Mean	5 =	12.50 A	Mean	4 =	13.17 A
Mean	6 =	14.13 A	Mean	7 =	12.90 A
Mean	7 =	12.90 A	Mean	5 =	12.50 A

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA PLOMO

Title: TESIS

Function: FACTOR

Experiment Model Number 1:  
Two Factor Completely Randomized Design

Data case no. 1 to 18.

Factorial ANOVA for the factors:

- Replication (Var 1: REPETICIONES) with values from 1 to 3
- Factor A (Var 2: FACTOR A) with values from 1 to 2
- Factor B (Var 3: FACTOR B) with values from 1 to 3

Function: ANOVA-1

Data case no. 1 to 21

One way ANOVA grouped over variable 2 (TRATAMIENTOS)  
with values from 1 to 7.

### Variable 4: PB1

#### ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

FV	gl	SC	CM	F	F.05	F.01
<i>Factor A</i>	1	5,336	5,336	34,76	4,60	8,86
<i>Factor B</i>	2	1,812	0,906	5,90	3,74	6,51
<i>A*B</i>	2	1,470	0,735	4,79	3,74	6,51
<i>testigo vs Resto</i>	1	11,006	11,006	71,70	4,60	8,86
<i>Error</i>	14	2,149	0,154			
<i>TOTAL</i>	20	21,773				

Coefficient of Variation: 6.85%

#### PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE TUKEY PARA Pb1

Title: TESIS

Function: RANGE¶

Error Mean Square = 0.1535  
Error Degrees of Freedom = 14  
No. of observations to calculate a mean = 3

Tukey's Honestly Significant Difference Test  
 $s_{\bar{y}} = 0.2262$  at  $\alpha = 0.050$

Original Order			Ranked Order		
Mean 1 =	4.147	D	Mean 7 =	7.493	A
Mean 2 =	4.887	CD	Mean 6 =	6.073	B
Mean 3 =	5.607	BC	Mean 4 =	5.993	B
Mean 4 =	5.993	B	Mean 5 =	5.840	BC
Mean 5 =	5.840	BC	Mean 3 =	5.607	BC
Mean 6 =	6.073	B	Mean 2 =	4.887	CD
Mean 7 =	7.493	A	Mean 1 =	4.147	D

=====

**Variable 5: PB2**

**ANALYSIS OF VARIANCE TABLE**

FV	gl	SC	CM	F	F.05	F.01
Factor A	1	2,219	2,219	18,62	4,60	8,86
Factor B	2	0,867	0,434	3,64	3,74	6,51
A*B	2	1,789	0,895	7,51	3,74	6,51
testigo vs Resto	1	5,185	5,185	43,52	4,60	8,86
Error	14	1,668	0,119			
TOTAL	20	11,728				

Coefficient of Variation: 6,70%

**PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE TUKEY PARA Pb2**

Title: TESIS

Function: RANGE¶

Error Mean Square = 0.1191  
Error Degrees of Freedom = 14

No. of observations to calculate a mean = 3

Tukey's Honestly Significant Difference Test

$s_{\bar{y}} = 0.1993$  at  $\alpha = 0.050$

Original Order			Ranked Order		
Mean 1 =	4.007	C	Mean 7 =	6.367	A
Mean 2 =	4.667	BC	Mean 4 =	5.600	AB
Mean 3 =	5.113	B	Mean 6 =	5.400	B
Mean 4 =	5.600	AB	Mean 3 =	5.113	B
Mean 5 =	4.893	BC	Mean 5 =	4.893	BC
Mean 6 =	5.400	B	Mean 2 =	4.667	BC
Mean 7 =	6.367	A	Mean 1 =	4.007	C

=====

**Variable 6: PB3**

**ANALYSIS OF VARIANCE TABLE**

<i>FV</i>	<i>gl</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>F.05</i>	<i>F.01</i>
<i>Factor A</i>	1	1,485	1,485	11,23	4,60	8,86
<i>Factor B</i>	2	0,167	0,084	0,63	3,74	6,51
<i>A*B</i>	2	2,090	1,045	7,90	3,74	6,51
<i>testigo vs Resto</i>	1	2,445	2,445	18,48	4,60	8,86
<i>Error</i>	14	1,852	0,132			
<i>TOTAL</i>	20	8,039				

Coefficient of Variation: 7,47%

**PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE TUKEY PARA Pb3**

Title: TESIS

Function: RANGE¶

Error Mean Square = 0.1323

Error Degrees of Freedom = 14

No. of observations to calculate a mean = 3

Tukey's Honestly Significant Difference Test  
 $s_ = 0.2100$  at  $\alpha = 0.050$

Original Order			Ranked Order		
Mean 1 =	3.853	C	Mean 7 =	5.707	A
Mean 2 =	4.630	BC	Mean 4 =	5.387	AB
Mean 3 =	4.850	ABC	Mean 6 =	4.860	ABC
Mean 4 =	5.387	AB	Mean 3 =	4.850	ABC
Mean 5 =	4.810	ABC	Mean 5 =	4.810	ABC
Mean 6 =	4.860	ABC	Mean 2 =	4.630	BC
Mean 7 =	5.707	A	Mean 1 =	3.853	C

=====

**Variable 7: PB4**

**ANALYSIS OF VARIANCE TABLE**

FV	gl	SC	CM	F	F.05	F.01
<i>Factor A</i>	1	6,601	6,601	41,07	4,60	8,86
<i>Factor B</i>	2	0,509	0,255	1,58	3,74	6,51
<i>A*B</i>	2	1,905	0,953	5,93	3,74	6,51
<i>testigo vs Resto</i>	1	2,913	2,913	18,13	4,60	8,86
<i>Error</i>	14	2,250	0,161			
<i>TOTAL</i>	20	14,178				

Coefficient of Variation: 9.25 %

**PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE TUKEY PARA Pb4**

Title: TESIS

Function: RANGE¶

Error Mean Square = 0.1607

Error Degrees of Freedom = 14

No. of observations to calculate a mean = 3

Tukey's Honestly Significant Difference Test  
 $s_ = 0.2315$  at  $\alpha = 0.050$

Original Order			Ranked Order		
Mean 1 =	3.507	CD	Mean 4 =	5.263	A
Mean 2 =	3.183	D	Mean 7 =	5.247	A
Mean 3 =	4.040	BCD	Mean 5 =	4.763	AB
Mean 4 =	5.263	A	Mean 6 =	4.337	ABC
Mean 5 =	4.763	AB	Mean 3 =	4.040	BCD
Mean 6 =	4.337	ABC	Mean 1 =	3.507	CD
Mean 7 =	5.247	A	Mean 2 =	3.183	D

## ANEXO D: FOTOGRAFÍAS

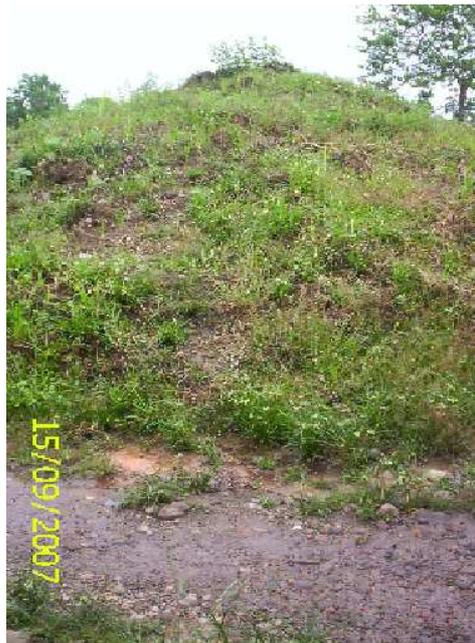
1) Compost



2) Bocashi



3) Montículo de suelo



4) Características del área de elaboración de bocashi



5) Trituración del material utilizado en la elaboración de bocashi



6) Disposición en capas de los materiales del bocashi.



7) Aplicación de la melaza y levadura disuelta en agua usando bomba.



8) Mezcla del material



9) Aireación durante el proceso de compostaje



10) Área de abonos PEPDA-SACHA



11) Almacenamiento de Compost



12) Estructura física del ensayo experimental de biorremediación



13) Acondicionamiento del suelo antes del tratamiento



14) Disposición de las Unidades Experimentales



15) Medición de la temperatura del suelo.



16) Humectación y aireación de las unidades experimentales de biorremediación



17) Muestreo de suelo



18) Bioestimulación.



19) Cepas utilizadas en el consorcio SACHA para el proceso de Bioaumentación

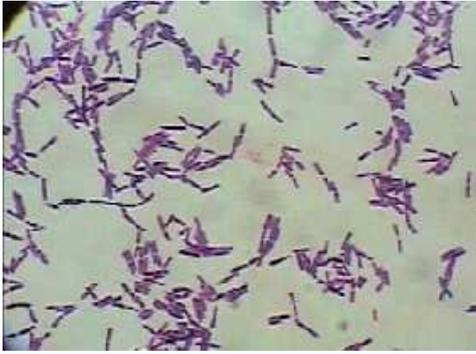


20) Reactivación de las cepas.

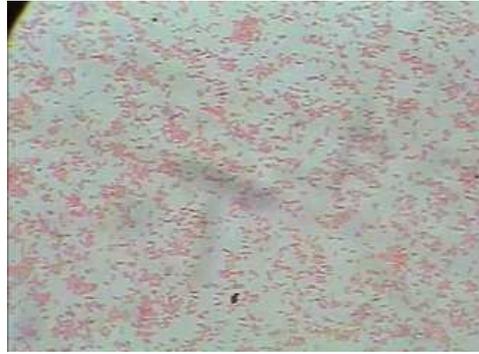


21) Tinción Gram de las cepas del consorcio.

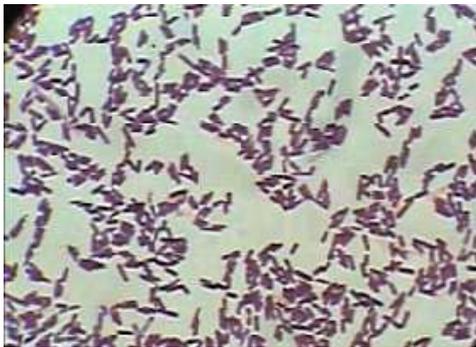
CEPA 1



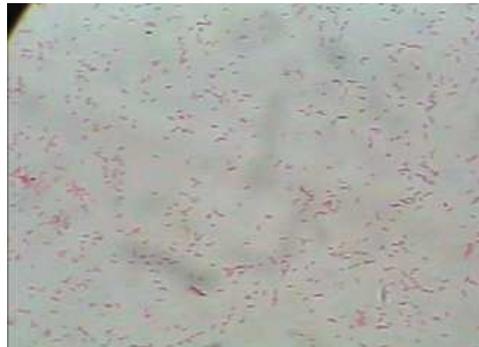
CEPA 6



CEPA 21



CEPA 68



CEPA 71



## 22) Producción de inóculo

Preinóculo



Incubación



Siembra del inóculo



Inóculo



23) Aplicación del inóculo en el campo



24) Procesamiento de las muestras de suelo para RHP

Material estéril



Incubación



Diluciones seriadas



Contaje

