

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO



FACULTAD DE INGENIERÍA CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Ambiental

TRABAJO DE TITULACIÓN

**“Bioremediación y monitoreo de suelos contaminados con Fueloil 6
usando *pseudomonas aeruginosa* y espectrometría de reflectancia
difusa en el UV-VIS.”**

Autor:

Kleber Montesdeoca

Tutor:

Ph.D. Víctor J García

Riobamba - Ecuador

Año 2018

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del Tribunal de Graduación del proyecto de investigación de tema: **“Bioremediación y monitoreo de suelos contaminados con Fuel Oil 6 usando *pseudomonas aeruginosa* y espectrometría de reflectancia difusa en el UV-VIS.”**, presentada por: Kleber Geovanny Montesdeoca Izurieta y dirigida por: PhD. Víctor J García.

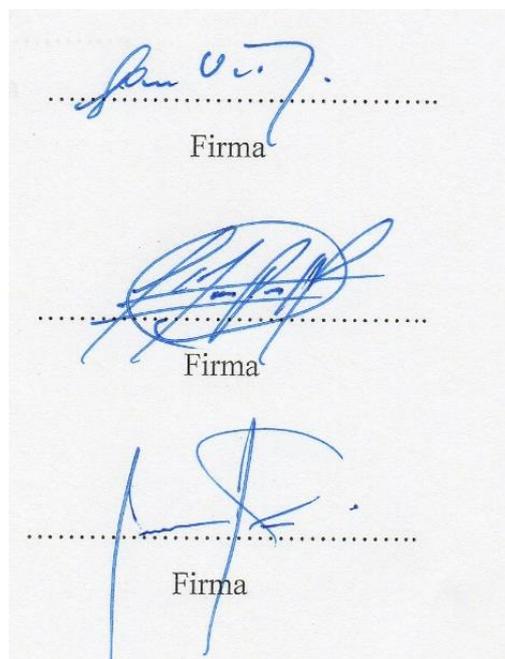
Una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación, se constató el cumplimiento de las observaciones realizadas y se remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Universidad Nacional de Chimborazo.

Para constancia de lo expuesto firman:

PhD. Víctor J García.
Tutor del Proyecto.

MsC. Marcel Paredes.
Miembro del Tribunal.

PhD. Iván Ríos
Miembro del Tribuna.



Firma

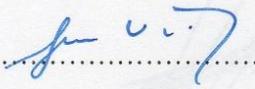
Firma

Firma

DECLARACIÓN EXPRESA DE TUTORÍA

Por la presente, certifico que el actual trabajo de investigación previo a la obtención de grado de Ingeniero Ambiental, elaborado por el señor Kleber Geovanny Montesdeoca Izurieta con el tema: **“Bioremediación y monitoreo de suelos contaminados con Fuel Oil 6 usando *pseudomonas aeruginosa* y espectrometría de reflectancia difusa en el UV-VIS.”**, fue realizado y supervisado bajo mi asesoramiento permanente en calidad de Tutor y Guía, por lo que se encuentra apto para ser presentado y defendido.

Es todo lo que puedo informar en honor a la verdad



.....

PhD. Víctor J García
C.I. 1757244122

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

Yo, Kleber Geovanny Montesdeoca Izurieta, con cédula de identidad No. 150085138-9, hago referencia como autor del presente trabajo de investigación, intitulado: **“Bioremediación y monitoreo de suelos contaminados con Fuel Oil 6 usando *pseudomonas aeruginosa* y espectrometría de reflectancia difusa en el UV-VIS.”**, dirigida por el tutor del proyecto, PhD. Víctor J García.

Manifiesto la originalidad en la conceptualización de ideas, interpretación de resultados, con el sustento de autores que han sido debidamente referenciados en el documento.



.....

Kleber Montesdeoca I.
C.I. 150085138-9

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a mi madre, Blanca Izurieta, mi tía, María Izurieta y a mi hermano Jonathan y el resto de mi familia, por todo el afecto, paciencia, y confianza que han brindado, por los consejos y frases que motivaron el esfuerzo para permanecer firme y luchar por cumplir las metas y no rendirse a medio camino y aprender a tomar las mejores decisiones.

Al PhD. Víctor J García, y PhD. Omaira Márquez, por compartir su sabiduría, por la predisposición, por el tiempo y la voluntad brindados, para el desarrollo del proyecto de investigación, por el esfuerzo, la confianza y el apoyo otorgados. Y porque a pesar de tener múltiples ocupaciones, siempre hubo tiempo para atender necesidades y solucionar problemas.

A mis amigos, personas que convirtieron esta gran etapa de la vida llamada “universidad” en toda una experiencia, compartiendo los mejores y peores momentos, entre risas o disgustos

Finalmente al grupo de trabajo del proyecto de investigación “Soil Organic Carbon Evaluation ad Sequestration in Ecuadorian Paramo Ecosystem”, al Ing. Robert Deley y el Laboratorio de servicios ambientales y el por todo el apoyo recibido durante la realización y culminación de este trabajo.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada especialmente a una de las primeras personas en las que pienso que nunca ha dejado de confiar, a pesar de las condiciones, ha permanecido firme a su amor incondicional, ha luchado por salir adelante y sacar adelante a sus hijos, y a pesar de los días grises, hacer lo posible para que un poco de sol pueda llegar a nuestros días.

Gracias mamá.

ÍNDICE

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL	ii
DECLARACIÓN EXPRESA DE TUTORÍA	iii
AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIA	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	4
OBJETIVOS	5
1. General:.....	5
2. Específicos:.....	5
ESTADO DEL ARTE:.....	5
1. Contaminación del suelo.....	5
2. Contaminación del suelo por hidrocarburos	5
3. Estado de los hidrocarburos en el suelo.....	6
4. Tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos.....	7
5. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.....	8
6. El papel de los microorganismos en la degradación de contaminantes orgánicos.....	8
7. Uso de <i>pseudomona aeruginosa</i> en la biorremediación de suelos contaminados	8
8. Factores que condicionan el desarrollo de pseudomonas en suelos contaminados con hidrocarburos.....	9
9. Capacidad metabólica del microorganismo	9
10. Nutrientes.....	9
11. Respiración y aireación.....	10
12. Tipos de contaminantes y su grado de toxicidad	10
13. Métodos para la determinación de hidrocarburos en el suelo	11

14. Aplicación de la teledetección en la identificación de hidrocarburos...	11
15. Identificación de firmas espectrales en cuerpos con presencia de hidrocarburos.....	11
16. Fuentes de error en la teledetección.	12
17. Determinación de hidrocarburos totales de petróleo (TPHs) por cromatografía de gases	13
18. El Fueloil 6.....	13
METODOLOGÍA	14
1. Identificación y aislameinto de <i>P. aureginosa</i>	14
2. Bio-aumentación y alimentación de la cepa aislada.....	16
3. Preparación de suelos	17
4. Suelo natural y arena de cuarzo	18
5. Diseño Experimental	19
6. Determinación de la cantidad de hidrocarburos usando el Índice de Hidrocarburos UNACH.	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
1. Asilamiento, identificación, bioaumentación e inoculación.....	20
2. Registro del espectro de reflectancia difusa.....	21
Arena de cuarzo.....	21
Suelo natural	24
3. Monitoreo de la biorremediación	26
Arena de Cuarzo.....	26
Suelo natural	28
4. Firma espectral de la Melaza	29
5. Firma espectral de la <i>p. aeruginosa</i>	29
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	32
ANEXOS.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tecnologías de recuperación de suelos contaminados con Hidrocarburos. Adaptada de Hernández <i>et al.</i> (2004).....	7
Figura 2. Tipos de reflectividad atendiendo a la rugosidad de la superficie del objeto. Adaptada de Lillesand, Kiefer, y Chipman (2015).	12
Figura 3. Toma de muestras de suelo contaminado de la empresa CELEC EP Termoesmeralda.....	15
Figura 4. Crecimiento de <i>Pseudomona aeruginosa</i> en agar cetrimida.	15
Figura 5. Kit API-20E antes de la adición de la solución bacteriana.	16
Figura 6. Sistema de numeración de las pruebas positivas, para determinar el número de identificación de enterobacterias por el sistema de identificación bioquímica API-20E. Fuente: (Giles, 1995).....	16
Figura 7. Bio-aumentación de <i>p. aeruginosa</i> en inóculo de melaza.....	17
Figura 8. Muestras mantenidas en incubación a 36°C.	18
Figura 9. Muestras inoculadas de suelo contaminadas con FO6 e inoculadas con <i>P. aeruginosa</i>	18
Figura 10. Kit API-20E, se muestran las reacciones producidas por la actividad bacteriana.....	20
Figura 11. Resultados de la introducción del código en el sistema web para la prueba API-20E.....	20
Figura 12. Espectros de reflectancia difusa de muestras de arena de cuarzo en su estado natural.	21
Figura 13. Espectro de reflectancia difusa de muestras de arena de cuarzo + Fueloil 6 al 6 % p/p.....	22
Figura 14. Espectro de reflectancia difusa para muestras de AC + FO6 al 6% + Melaza.	23
Figura 15. Registro del espectro de reflectancia difusa para muestras de AC + FO6 al 6% + Melaza + <i>p. aeruginosa</i> el día 0.....	23
Figura 16. Espectro de reflectancia difusa para muestras de suelo natural.	24
Figura 17. Registro del espectro de reflectancia difusa para muestras de SN + FO6 (6%).....	25
Figura 18. Espectro de reflectancia difusa para muestras de SN + FO6 (6%) + Melaza.	25

Figura 19. Espectro de reflectancia difusa de muestras de SN + FO6 al 6% + Melaza + <i>P. aeruginosa</i> el día 0.	26
Figura 20. Registro de los espectros de reflectancia difusa en muestras de arena de cuarzo en estado natural (AC), contamiandas con FO6 e inoculadas con <i>p. aeruginosa</i> una vez trascurrido 0, 4, 7, 11, 14, 18 y 23 días de su inoculación.	27
Figura 21. . Registro de los espectros de reflectancia difusa en muestras de suelo natural (SN), contamiandas con FO6 e inoculadas con <i>p. aeruginosa</i> una vez trascurrido 0, 4, 7, 11, 14, 18 y 23 días de su inoculación.	29
Figura 22. Espectro de reflectancia difusa de la melaza y su primera derivada.	30
Figura 23. Espectro de reflectancia difusa de la <i>pseudomona aeruginosa</i> y su primera derivada.	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tecnologías de recuperación de suelos contaminados con Hidrocarburos.	7
Tabla 2. Características del Fueloil 6.....	14
Tabla 3. Número total de Espectros de Reflectancia Difusa registrados para cada material analizado.	19
Tabla 4. Cálculo del <i>IHU</i> en muestras de arena de cuarzo contaminadas con FO6.	27
Tabla 5. Valores de <i>CH</i> calculado en muestras de arena de cuarzo contaminadas con Fueloil 6.	27
Tabla 6. Cálculo del <i>IHU</i> para las muestras de suelo contaminadas con FO6.....	28
Tabla 7. Valores del <i>CH</i> calculado para las muestras de suelo contaminadas con FO6	28

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Tabla de lectura para las pruebas bioquímicas del sistema API 20e	35
ANEXO 2. Reactivos: VP1: Hidróxido de potasio 40%.TDA: Cloruro férrico 10%; IND: Reactivo de Kovac's.....	36
ANEXO 3. Extracción de muestras para identificación mediante sistema API 2e.	36
ANEXO 4. Introducción del aspado de la muestra en solución salina.	37
ANEXO 5. Aplicación del medio de solución salina con microorganismos en el kit API 20-e.....	37
ANEXO 6. Aplicación de reactivo TDA (Cloruro Férrico 10%) para lectura de reacción,	38
ANEXO 7. Presentación del kit API 20E.	38
ANEXO 8. Preparación de agar cetrimida para cultivo de bacterias del género <i>Pseudomona</i>	39
ANEXO 9. Equipo de radiometría para medición de ERD's, en muestras de suelo y arena de cuarzo.....	39
ANEXO 10. Cambio de coloración en el proceso de contaminación controlada con Fo6 en arena de cuarzo.....	40
ANEXO 11. Cambio de coloración en el proceso de contaminación controlada con Fo6 en suelo natural.	40

RESUMEN

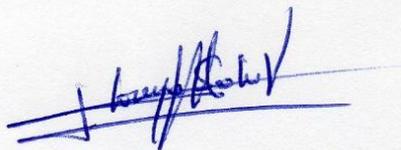
El objetivo de este trabajo fue monitorear el proceso de bioremediación de suelos contaminados con Fueloil 6, usando *pseudomonas aeruginosa* y espectrometría de reflectancia difusa en el UV-VIS. Para lograr nuestro objetivo aislamos *pseudomonas aeruginosa* de un suelo natural contaminado con fueloil 6 de la Planta Termoeléctrica de Esmeralda. Monitoreamos a los 0, 7, 14, 21 y 23 días la biorremediación de muestras de suelo natural y de arena de cuarzo contaminadas de manera controlada. Registramos el espectro de reflectancia difusa y usamos el Indicador de Hidrocarburos UNACH para cuantificar la cantidad de hidrocarburos en dichas muestras. Procesamos los espectros de reflectancia difusa para encontrar elementos que aporten información sobre la firma espectral de la melaza (medio usado para bio-aumentación) y de la *pseudomonas aeruginosa*. Nuestros resultados revelan que la cantidad de hidrocarburos en las muestras contaminadas de arena de cuarzo y suelo natural se redujo en 13,6 % y 45,8 % en 23 días, respectivamente. El tratamiento de los espectros de reflectancia difusa permitió encontrar elementos de la firma espectral de la melaza y de la *pseudomonas aeruginosa*. Estos resultados pueden ser importantes en aplicaciones que impliquen el control y dosificación de la melaza, así como la distinción y conteo unidades formadoras de colonias de *pseudomonas aeruginosa* usando la reflectancia difusa. Así, la biorremediación con *pseudomonas aeruginosa* representa una solución técnica viable para la disposición y saneamiento de los suelos contaminados con fueloil 6. La reflectancia difusa es una tecnología prometedora para el desarrollo de técnicas portátiles y satelitales orientadas al monitoreo de la biorremediación de suelos contaminados con fueloil 6.

Palabras clave: Biorremediación, FuelOil 6, *Pseudomonas aeruginosa*, reflectancia difusa, firma espectral.

ABSTRACT

The objective of this study was to monitor the process of bioremediation of contaminated soils with Fuel oil 6, using *pseudomonas aeruginosa* and diffuse reflectance spectrometry in the UV-VIS. To achieve the objective, *pseudomonas aeruginosa* was isolated from a natural soil contaminated with fuel oil 6 from the Thermoelectric plant from Esmeraldas. It was monitored at 0, 7, 14, 21 and 23 days, the bioremediation of samples of the natural soil and quartz sand contaminated in a controlled manner. Diffuse reflectance spectrum was registered and the UNACH hydrocarbons indicator was used to quantify the amount of hydrocarbons in these samples. Diffuse reflectance spectrum was processed to find elements that provide information on the spectral signature of molasses (medium used for bio-augmentation) and *Pseudomonas aeruginosa*. These results reveal that the amount of hydrocarbons in the contaminated samples of quartz sand and natural soil was reduced by 13.6% and 45,8% in 23 days, respectively. The treatment of diffuse reflectance spectrum allowed to find elements of the spectral signature of molasses and *Pseudomona aeruginosa*. These results may be important in applications involving the control and dosage of molasses, as well as the distinction and counting colony forming units of *Pseudomona aeruginosa* using diffuse reflectance. Thus, bioremediation with *Pseudomona aeruginosa* represents a viable technical solution for the disposal and sanitation of contaminated soils with fueloil 6. Diffuse reflectance is a promising technology for the development of portable and satellite techniques aimed at monitoring the bioremediation of contaminated soils with fueloil 6.

Keywords: Bioremediation, FuelOil 6, *Pseudomonas aeruginosa*, diffuse reflectance, spectral signature.



Reviewed by: Solís Lorena
Language Center Teacher



INTRODUCCIÓN

En la problemática ambiental actual, es necesario el desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías que permitan determinar de manera rápida y en tiempo real el estado del área de estudio. En este contexto el propósito de este proyecto, es el monitoreo de la biorremediación de suelos contaminados con Fueloil 6 (FO6) usando espectrometría de reflectancia difusa en el Vis-UV.

Ecuador se inició en la actividad petrolera en la década de 1930, y su producción ha incrementado hasta llegar a 200 millones de barriles al año. En la actualidad, de la totalidad del petróleo extraído, el 54% está destinado a las exportaciones, el otro porcentaje está destinado a cubrir la demanda nacional de derivados hidrocarburíferos. La producción necesaria para cubrir la demanda nacional de hidrocarburos según Petroecuador es: diésel 34%, gasolina 24%, gas licuado de petróleo (GLP) 17%, asfaltos 1%, residuos 5%, Fueloil 13 %, combustible para avión 4% y otros el 1%. Según datos proporcionados por el Instituto Nacional de Eficiencia Energética y Energías Renovables a finales del año 2016 en Ecuador, el 49,1% de la energía utilizada provenía de centrales térmicas, de las cuales el 40,8% utiliza Fuel Oil como combustible, lo que equivale a 2 millones de barriles de Fueloil mensuales. El FO6 es el combustible comercial más pesado que se obtiene en la refinación de petróleo crudo y es una de las principales fuentes de energía en la producción de electricidad en el Ecuador. El FO6 es producido en la Refinería de Esmeraldas y transportado por oleoductos, barcos y/o auto tanques a las centrales térmicas. Por la importancia que tiene el FO6 en la producción energética en el país, sumado a su complejidad molecular, el FO6 es el principal hidrocarburo presente en fugas y derrames, especialmente en la contaminación del recurso suelo durante los procesos de producción, transporte, almacenamiento y/o utilización.

En general los hidrocarburos presentes en el suelo son perjudiciales para la mayor parte de la vida microbiana. Aunque existen microorganismos que producen enzimas que descomponen las largas cadenas de carbono de los hidrocarburos, transformándolos en moléculas más simples (Gómez *et al.*, 2008). Uno de estos microorganismos es la bacteria *pseudomona aeruginosa* (*P. aeruginosa*), que se encuentra de manera natural en el suelo formando pequeñas colonias. La bacteria tiene la capacidad de sobrevivir y reproducirse en suelos contaminados con FO6, ya que, en su ciclo catabólico esta bacteria produce enzimas que descomponen las moléculas del hidrocarburo y le permiten nutrirse de ellas. Esta capacidad catabólica convierte a la bacteria en un candidato potencial para el

desarrollo e implementación de protocolos de bio-rremediación de suelos contaminados con FO6. En este contexto es importante el monitoreo del proceso de degradación del contaminante (Ortiz, Sanz, Dorado, y Villar, 2007). En este sentido, el uso de la espectrometría de reflectancia difusa de suelos contaminados puede hacer posible el monitoreo de estos procesos de remediación, sobre todo considerando la extensión alcanzada por el derrame y la tecnología de percepción remota que hace disponible imágenes de grandes extensiones con metadatos que incluyen la información espectral (Cedeño, 2017).

PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Según datos del Ministerio del Ambiente del Ecuador, la media de derrames en el sistema de oleoductos ecuatoriano entre 2000 y 2010 fue de casi 50 al año. Y en 2011, según datos del ministerio citados por el “Diario Hoy” y mencionados en la revista “BBC Mundo” el 13 junio 2013, se reportaron 60 derrames de hidrocarburos en el país (Gil, 2013). Entre las causas por las que ocurren estos derrames se pueden mencionar la corrosión de las estructuras, atentados, problemas por fallas mecánicas, desastres naturales y los derrames producidos por fallas humanas que representan el 12% de las incidencias. Gran parte del petróleo ecuatoriano es obtenido en yacimientos ubicados en la Amazonía en la zona oriental del país, desde donde son bombeados a través del Sistema de Oleoducto Trans Ecuatoriano (SOTE) hasta las refinerías ubicadas en el oeste del territorio, cerca del océano pacífico, con un recorrido de casi 500 Km. Los efectos ambientales ocasionados por derrames de petróleo y sus derivados están entre los más devastadores. Estos hidrocarburos contaminan de manera prolongada los recursos, afectando directamente a la fauna, flora y micro-fauna. Considerando la importancia para el sector energético del país, el alto índice de derrames producidos y el alto riesgo que significa para el medio ambiente la contaminación por FO6 en suelos. Existe la necesidad de implementar metodologías orientadas a la detección y monitoreo en tiempo real de derrames en suelos contaminados con FO6.

En la Universidad Nacional de Chimborazo se ha desarrollado un índice de Hidrocarburos (IHU). Este indicador usa el espectro de reflectancia difusa registrado directamente en el sitio o con la ayuda de imágenes satelitales. El IHU ha mostrado ser muy conveniente para la detección temprana de derrames de FO6 que afectan el suelo. Así, que con la problemática planteada anteriormente, y con la disponibilidad del IHU se

propone la validación del IHU en el monitoreo de la biorremediación de suelos contaminados con FO6.

OBJETIVOS

1. General:

Monitorear el proceso de bio-remediación de suelos contaminados con Fueloil 6 usando *pseudomonas aeruginosa* y espectrometría de reflectancia difusa en el UV-VIS.

2. Específicos:

1. Aislar la cepa bacteriana de un suelo natural contaminado con fueloil 6, identificar la cepa bacteriana, bioaumentar en solución de melaza, e inocular muestras contaminadas con FO6.
2. Monitorear la biorremediación de las muestras usando el espectro de reflectancia difusa registrado a los 0, 7, 14, 21 y 23 días, el indicador de hidrocarburos UNACH y cuantificando la cantidad de hidrocarburos en dichas muestras.
3. Distinguir en el espectro de reflectancia difusa elementos que aporten información sobre la firma espectral de la melaza y la cepa bacteriana *p. aeruginosa*.

ESTADO DEL ARTE:

1. Contaminación del suelo

Se considera un suelo contaminado cuando las características físico-químicas o biológicas del mismo han sido alteradas negativamente por la presencia de compuestos o elementos de origen natural o antrópico. Estos contaminantes son ajenos al suelo y en general son considerados una amenaza para el funcionamiento ecológico del suelo cuando superan el umbral de capacidad de contención o degradación que tiene el suelo. Estos contaminantes con frecuencia son de carácter peligroso y representan un riesgo para la salud de los humanos y de los ecosistemas (Gabari y Fernandez, 2011).

2. Contaminación del suelo por hidrocarburos

A comienzos del siglo XXI, los suelos contaminados con hidrocarburos representaban el 70% del total de los ecosistemas impactados (Ortiz *et al.*, 2005). Un derrame de hidrocarburos, de forma generalizada, lleva consigo una serie de cambios progresivos de las propiedades físico-químicas del suelo e impide el intercambio gaseoso con la atmósfera. Estos cambios, se atribuyen al proceso de intemperización o meteorización, el cual se inicia una vez que ocurre el derrame y continúa indefinidamente, estos cambios

usualmente involucran: evaporación, disolución, dispersión, oxidación, emulsión, sedimentación y biodegradación (Riesco y Vallès, 2012). Los efectos más relevantes en cuanto al impacto de los hidrocarburos en el ambiente y que son de mayor preocupación son: la acumulación y magnificación en cadenas tróficas, la pérdida de nichos ecológicos y la contaminación de aguas subterráneas (Naranjo, 2017).

A temperatura ambiente, los hidrocarburos con cuatro átomos de carbono se encuentra en estado gaseoso, los de cinco a veinte átomos de carbono se encuentran en estado líquido, y aquellos con más de veinte átomos de carbono se encuentran en estado sólido (Hernández Acosta, Rubiños Panta, y Alvarado López, 2004).

3. Estado de los hidrocarburos en el suelo

En general los suelos son contaminados con hidrocarburos debido a insuficiencias en su transporte y almacenamiento, en el mantenimiento de infraestructuras física que operan con hidrocarburos, en la descarga de los mismos en instalaciones de procesamiento y petroquímicas, así como por la rotura de oleoductos (Hernández *et al.*, 2004). En cantidades menores pero relacionadas al ámbito urbano, existen focos de contaminación del suelo que tienen su origen en un manejo inadecuado de desechos municipales, en los liberados y transportados por vía atmosférica, y en los producidos por organismos, como el metano. En zonas donde existe una mayor pluviosidad existe un mayor transporte de hidrocarburos hacia el suelo (Hernández *et al.*, 2004).

Según explica McGill *et al.*, 1981, en su descripción sobre el destino de los hidrocarburos en el suelo (Figura 1), Establece que los hidrocarburos atraviesan por dos procesos: la volatilización y la fotooxidación. Posteriormente, atraviesan por un proceso de bio-degradación, dando como resultado productos intermedios, células microbianas y CO₂ que se va a la atmósfera. Por último, los productos derivados de la descomposición biológica siguen dos caminos, por una parte pueden ser re-incorporados al humus o pueden llegar a sustratos de suelo inferiores debido a la lixiviación (Hernández *et al.*, 2004).

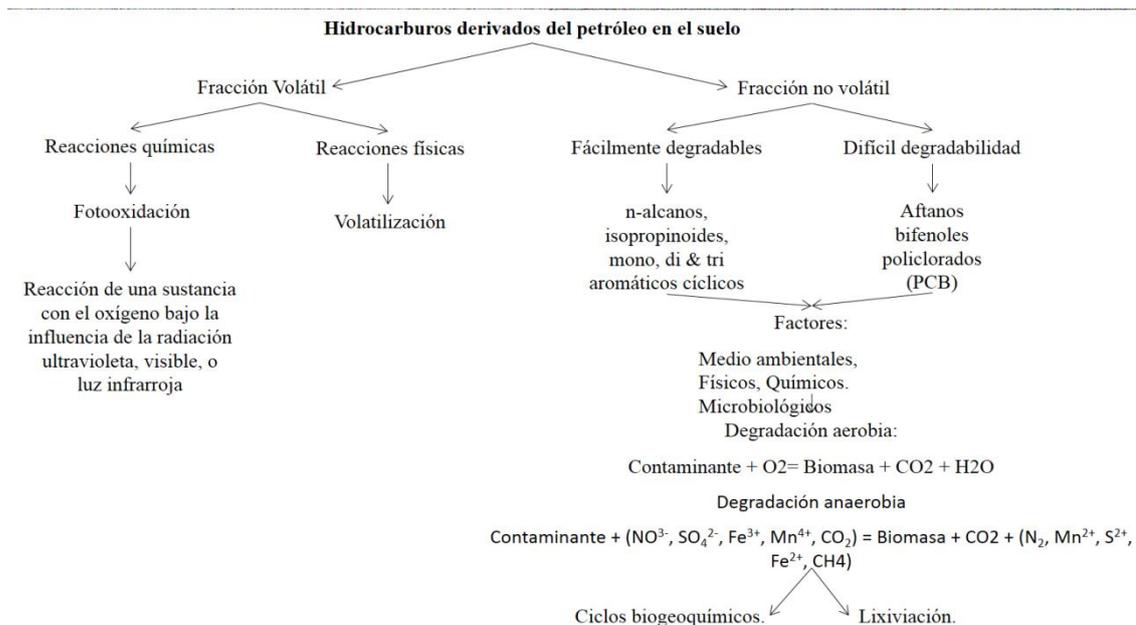


Figura 1. Tecnologías de recuperación de suelos contaminados con Hidrocarburos. Adaptada de Hernández *et al.* (2004)

4. Tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos.

Los tratamientos que se usan en la descontaminación de suelos contaminados con hidrocarburos se clasifican en tratamientos *ex situ* (se excava el suelo contaminado) y tratamientos *in situ* (no se excava el suelo contaminado). Las técnicas empleadas se clasifican en “*off-site*”, se trata el suelo contaminado en una instalación fuera del emplazamiento y “*on-line*”, se trata el suelo contaminado en el mismo emplazamiento (Riesco y Vallès, 2012). En la Tabla 1 se listan un conjunto de tecnologías disponibles para la descontaminación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Tabla 1. Tecnologías de recuperación de suelos contaminados con Hidrocarburos.

TRATAMIENTOS EX SITU	TRATAMIENTOS IN SITU
Térmicos	
Desorción térmica	
Incineración	
Físico-químicos	Físico-químicos
Extracción con disolventes	Extracción con vapor
Lavado	Lavado
Oxidación/reducción	Solidificación/estabilización
Deshalogenación química	Electrorecuperación
Solidificación/estabilización	
Biológicos	Biológicos
Biopilas	Biorremediación
Biodegradación en reactor	Fitorremediación

Fuente: (Riesco y Vallès, 2012)

5. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos

La biorremediación “*in situ*” es una técnica biológica muy conveniente para la recuperación de suelos, ya que no es necesaria la preparación y excavación del material contaminado (Riesco y Vallès, 2012). El uso de microorganismos autóctonos bioestimulados con la adición de nutrientes y oxígeno en el suelo, así como, la inoculación de consorcios bacterianos previamente extraída del mismo suelo, es una técnica utilizada ampliamente para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos. Estudios previos han mostrado que el *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilis*, *Acinetobacter junii*, y *Pseudomonas sp* son microorganismos capaces de sobrevivir, desarrollarse y proliferar en ambientes contaminados con hidrocarburos. Esto es posible debido a que sus ciclos catabólicos incluyen la producción de enzimas que degradan los hidrocarburos (Benavides *et al.*, 2006).

6. El papel de los microorganismos en la degradación de contaminantes orgánicos

El proceso de degradación de contaminantes orgánicos en el suelo ocurre porque los microorganismos emplean al contaminante orgánico como fuente de carbono y energía para nutrirse y así poder crecer y reproducirse (Hernández *et al.*, 2004).

Los microorganismos degradadores actúan sobre un amplio rango de compuestos, debido a la versatilidad en realizar procesos metabólicos que implican complejas reacciones químicas que les permiten degradar los contaminantes y transformarlos compuestos más simples y útiles para las plantas.

7. Uso de *pseudomona aeruginosa* en la biorremediación de suelos contaminados

Una característica importante de las bacterias es que tienen la capacidad de adaptarse rápidamente a cambios bruscos en su ambiente natural, como el que ocurre cuando son expuestas a contaminantes.

Las *Pseudomonas* son bacterias productoras de biosurfactantes como los ramnolípidos involucrados en procesos de remoción de aceites y productos relacionados (Benavides *et al.*, 2006). Los ramnolípidos son sustancias que intervienen en la actividad de la superficie de un contaminante, haciendo que se desprenda del sustrato al que este adherido, y contribuyendo a que sea más vulnerable a la degradación por parte de los microorganismos. Estudios realizados comparando diversos sustratos, muestran que aquellos sustratos hidrofóbicos tales como aceites vegetales, grasas, alcoholes de cadena larga e hidrocarburos derivados del petróleo estimulan altos niveles de producción de ramnolípidos (100-165 mg/g sustrato) en los microorganismos (Giraldo, 2012).

Scheibenbogen, Zytner, Lee, y Trevors (1994) reportaron que los ramnolípidos de la cepa de *P. aeruginosa* UG2 son capaces de remover efectivamente una mezcla de hidrocarburos de suelos arenosos, y que el grado de remoción depende del tipo de hidrocarburo removido y la concentración del biosurfactante. En un estudio previo, estos autores reportaron que el ramnolípidos de la misma cepa puede remover más hidrocarburos de suelos arenosos que de suelos fangosos (Giraldo, 2012).

8. Factores que condicionan el desarrollo de pseudomonas en suelos contaminados con hidrocarburos.

Entre las condiciones físicas se encuentran factores ambientales como el pH (6-8), temperatura (20° C - 40° C), concentración de minerales y nutrientes, humedad del suelo (25 – 75 % de la capacidad de campo), y cantidad de oxígeno disponible. Entre las condiciones químicas encontramos la estructura molecular del contaminante, su concentración y la presencia de una población microbiana potencialmente activa y sana.

La velocidad de degradación aumenta con la temperatura, por lo que un incremento de la misma es útil. Cuando la temperatura se incrementa en 10°C la tasa biorremediación se duplica (Gómez, *et al.*, 2008).

9. Capacidad metabólica del microorganismo

Se ha logrado estimar que la cantidad suficiente de microorganismos para lograr un adecuado proceso de biodegradación es de 10³ a 10⁴ UFC (Unidades formadoras de colonias)/g suelo, capaces de catabolizar y mineralizar el contaminante a sus componentes más simples, tales como C, H, O y H₂O (Gómez *et al.*, 2008).

10. Nutrientes

Los nutrientes son sustancias químicas necesarias para la actividad microbiana y metabólica de la *Pseudomonas* y se dividen en dos grandes grupos: macronutrientes y micronutrientes. Entre los macronutrientes de mayor importancia se encuentran; el carbono (C) el cual es obtenido del mismo contaminante, como fuente de energía; el Nitrógeno (N), necesario para la producción de aminoácidos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos; El fósforo (P) que interviene en la formación de adenosín trifosfato (ATP) y en la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos en los procesos de reproducción y degradación; El Potasio (K) requerido por enzimas para catalizar diferentes reacciones. (Gómez *et al.*, 2008). La concentración ideal de macronutrientes para el desarrollo microbiano está ubicada dentro de un rango normal de 100:10:1 a 100:2:0,2 y donde los números representan la cantidad de carbono, nitrógeno y fósforo, respectivamente

(Gómez *et al.*, 2008). En ocasiones, se incorpora fertilizantes de uso agrícola como urea o sulfato de amonio y de origen orgánico como estiércol, para acelerar el proceso de biorremediación ya que aportan grandes cantidades de los macronutrientes que son necesarios para la buena salud de los microorganismos.

11. Respiración y aireación

La energía necesaria para el crecimiento microbiano se obtiene durante el proceso de oxidación de materiales reducidos, donde las enzimas microbianas catalizan la transferencia de los electrones. Este proceso se denomina “respiración microbiana”, y se basa en que en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, producen una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía. La cadena la inicia un sustrato orgánico (compuestos hidrocarburos) y actúa como donador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia (Gómez *et al.*, 2008).

El oxígeno generalmente es el mejor aceptor de electrones, es decir, el que produce la mayor energía libre en una reacción completa. En consecuencia, para un mismo sustrato orgánico, los microorganismos que emplean el oxígeno como agente oxidante pueden generar mayor energía que aquellos que emplean nitratos, sulfatos ú otros aceptores de electrones alternativos, logrando de esta forma crecer a mayor velocidad, lo que implica un mayor consumo del sustrato. Por lo tanto la biorremediación aerobia es típicamente más eficiente que la biorremediación de contaminantes orgánicos en forma anaerobia (Gómez *et al.*, 2008).

12. Tipos de contaminantes y su grado de toxicidad

En muchos casos, el contaminante puede tener una alta toxicidad intrínseca para los microorganismos o estar presente a concentraciones que son tóxicas. La toxicidad de los contaminantes a los microorganismos surge de dos mecanismos: 1) la membrana plasmática del microorganismo es afectada ya que el contaminante actúa como un agente con superficie activa. 2) puede ser una toxina metabólica para la bacteria. Se conoce que los compuestos aromáticos son más resistentes a la biodegradación que los compuestos alifáticos.

Un compuesto recalcitrante es un químico que tiene una resistencia inherente a cualquier grado de biodegradación. Por ejemplo, los bifenilos policlorinados (Hernández *et al.*, 2004).

13. Métodos para la determinación de hidrocarburos en el suelo

Existe una gran variedad de métodos analíticos para la determinación de productos derivados de petróleo en el suelo, pero la complejidad inherente ha hecho que pierdan vigencia de manera progresiva.

Los métodos usuales para la determinación de los productos del petróleo son la cromatografía de gases (GC) con diversos detectores y la espectrometría infrarroja (IR).

14. Aplicación de la teledetección en la identificación de hidrocarburos.

La teledetección se define como la observación a distancia de los objetos, sin estar en contacto directo con ellos. Las características químicas de los hidrocarburos posibilitan la identificación de los mismos a través de procesos de teledetección fundamentada en el registro del Espectro de Reflectancia Difusa (firma espectral) (Cloutis, 1989).

(Cloutis, 1989; Hörig, Kühn, Oschütz, y Lehmann, 2001) encontraron que los materiales que contenían hidrocarburos exhiben bandas de absorción de radiación electromagnética en su respectiva firma espectral en las longitudes de onda de 1730 nm y 2310 nm. Algunos investigadores preferían utilizar el valor de 2310 nm, puesto que el valor 1730 nm es próximo a una banda de absorción en la firma espectral del agua (Villamizar, 2015).

La teledetección fundamentada en registro del espectro de reflectancia difusa representa una alternativa importante ya que permite, entre otras cosas, reducir los esfuerzos en campo para la identificación de estas emanaciones, lo que implica además un ahorro significativo de los costos logísticos propios de los métodos tradicionales de campañas de campo (Rodríguez y Júnior, 2013). Mostrando alta sensibilidad, selectividad, reproducibilidad y ausencia total de solventes (Santa, Serrano y Stashenko, 2002).

15. Identificación de firmas espectrales en cuerpos con presencia de hidrocarburos.

En los estudios realizados por el Instituto Federal de Geociencias y Recursos Naturales, se demostró que la teledetección hiperespectral se puede usar para detectar hidrocarburos de manera eficiente. Las sustancias portadoras de hidrocarburos poseen características típicas que se hacen visibles en el espectro de reflectancia difusa (Hörig, Kühn, Oschütz, y Lehmann, 2001).

16. Fuentes de error en la teledetección.

1. Variaciones en la intensidad de radiación registrada. Esta fuente de error se da sobre todo en el tipo de sensores, siendo más recurrente en los sensores de tipo “whiskbroom”. Al variar el tamaño de la celda a medida que el barrido se aleja de la intersección entre la vertical del lente y el cuerpo a observar, se registra mayor intensidad porque la unidad de resolución en el terreno es mayor. Aunque radiométricamente se registra una intensidad más alta, si se pretende discriminar un objeto de menor tamaño que la unidad de resolución en terreno, para un determinado ángulo, el material de fondo contamina su reflectividad aportando la suya propia (Villamizar, 2015).
2. Tipo de superficie. La forma geométrica en la que un cuerpo refleja energía es de vital importancia. El factor fundamental es la rugosidad de la superficie del objeto de interés. Como se puede observar en la Figura 2.

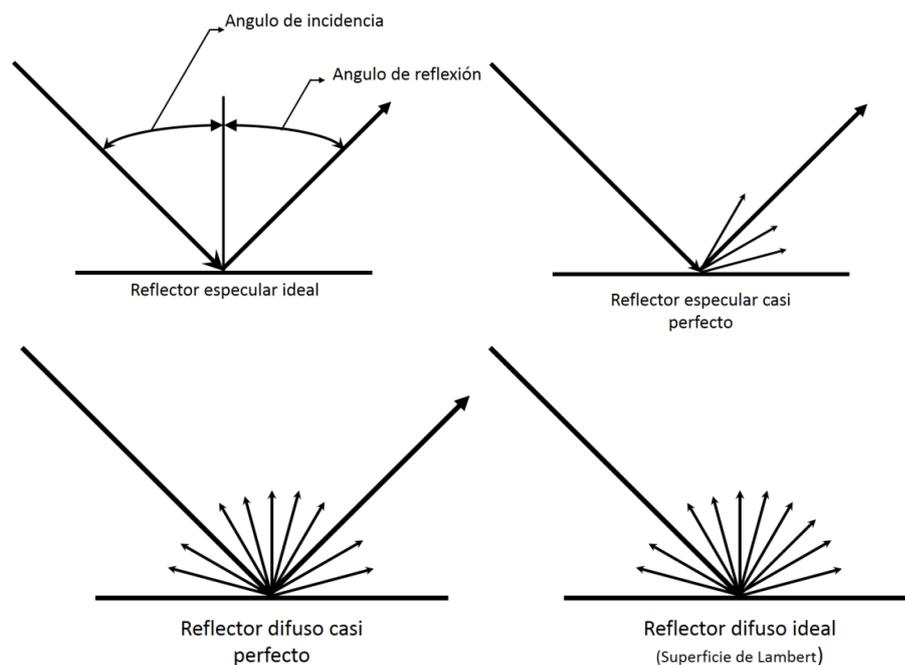


Figura 2. Tipos de reflectividad atendiendo a la rugosidad de la superficie del objeto. Adaptada de Lillesand, Kiefer, y Chipman (2015).

3. Calibración interna de la parte térmica del escáner. En función de la precisión de la calibración se obtendrán datos de mejor o peor calidad (Villamizar, 2015).

17. Determinación de hidrocarburos totales de petróleo (TPHs) por cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una técnica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte.

La mayor parte de los combustibles, solventes y aceites derivados del petróleo pueden identificarse mediante cromatografía de gases. La forma de identificarlos usualmente se fundamenta en el los puntos de ebullición o rango de destilación. Los hidrocarburos saturados de cadena lineal pueden servir de patrones de calibración a través de sus puntos de ebullición.

Se ha demostrado que la temperatura de ebullición de cada hidrocarburo aumenta a medida que aumenta el tamaño del alcano (la cantidad de átomos de carbono). Esto se debe a que las fuerzas intermoleculares son mayores cuando la molécula es más grande. Por ejemplo, el punto de ebullición del butano es $-0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ mientras que el punto de ebullición del nonano es $150,8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se ha encontrado una relación entre el tamaño de las moléculas de los hidrocarburos y el estado físico en que se encuentran a 20°C a la presión de 1 atm. En general, en esas condiciones, los hidrocarburos en estado gaseoso tienen las moléculas más pequeñas, formadas por 1 a 4 átomos de C; con moléculas más grandes, entre 5 y 16 átomos de C se encuentran en estado líquido, mientras que los hidrocarburos en estado sólido tienen moléculas constituidas por más de 16 átomos de C.

La cuantificación de los hidrocarburos de petróleo se realiza por la sumatoria de las áreas de los picos, los cuales resaltan la presencia de un elemento específico.

18. El Fueloil 6

Los fuelóleos refinados consisten en residuos que quedan después de la destilación o mezclas de residuos y destilados. El FO6 es el residuo luego de la destilación del petróleo crudo para obtener gasolina, naftas y diésel. Por esta razón, la composición del FO6 es más compleja y su contenido de impurezas es mayor (Cedeño, 2017). En la Tabla 2 se listan las características más relevantes del FO6.

Tabla 2. Características del Fueloil 6.

Identificación	Resultado	Unidad
Gravedad API, @ 60° F *	11,5	Grados
Viscosidad Cinemática @ 50°c *	628,4	centistokes
Agua y sedimento *	0,05	% volumen
Cenizas *	0,056	% masa
Residuo de carbón Conradson *	15,5	% masa
Asfáltenos *	12,8	% masa
Vanadio *	242	Ppm
Sodio *	17	Ppm
Níquel *	79	Ppm
Azufre *	1,96	% masa
Parafinas **	5,9	% volumen
Alquilbencenos **	1,9	% volumen
Naftalenos **	2,6	% volumen
Fenantrenos **	11,6	% volumen
Otros Hidrocarburos Aromáticos **	57,8	% volumen

Fuente: (Central Térmica Termoesmeraldas, 2014) *(Todd, Chessin, y Colman, 1999)**

El rango de carbonos (número de átomos de carbono) dentro de esta fracción varía desde C20 hasta C40, distribuido aproximadamente en un 25% de hidrocarburos aromáticos políclicos (HAP), 15% de parafínicos, 45% de nafténicos y 15% de compuestos que contienen metales, oxígeno o azufre, Los (HAP) son compuestos peligrosos y persistentes del FO6 que pueden ocasionar riesgos de salud a las personas y ocasionar perjuicios al ambiente. Su uso comercial e industrial se limita a condiciones donde la fuente de calor sea lo suficientemente fuerte producir la combustión (Todd, Chessin, y Colman, 1999).

METODOLOGÍA

La temática de investigación se caracterizó por ser exploratoria, su objetivo fue examinar un tema o problema de investigación poco estudiado. Los estudios exploratorios sirven para familiarizarnos con fenómenos relativamente desconocidos, obtener información sobre la posibilidad de llevar a cabo una investigación más completa respecto de un contexto particular, investigar nuevos problemas (Sampieri, Fernández, y Baptista, 2010).

1. Identificación y aislamiento de *P. aureginosa*.

Para el aislamiento de la cepa bacteriana se tomó una muestra al azar de suelos contaminados con hidrocarburos proveniente de la empresa pública CELEC EP Termoesmeraldas (Figura 3). De esta muestra se extrajo una muestra de 1 g para el cultivo en placas, y se llevó a dilución en solución salina (agua + NaCl) a una concentración de 5%. después de agitación en el equipo vórtex se llevó 1 ml de cada dilución por medio de micro-pipeta al cultivo en cajas petri con agar cetrimida en diluciones de 10^{-3} hasta 10^{-5} .



Figura 3. Toma de muestras de suelo contaminado de la empresa CELEC EP Termoesmeraldas.

Agar cetrimida es un medio de cultivo idóneo para el aislamiento e identificación de bacterias *Pseudomona aeruginosa*, debido a que es un medio selectivo para este tipo de bacteria, y estimula la generación de pigmentos, de esta manera se produce una tonalidad verdosa en la medida que la bacteria crece (Figura 4).

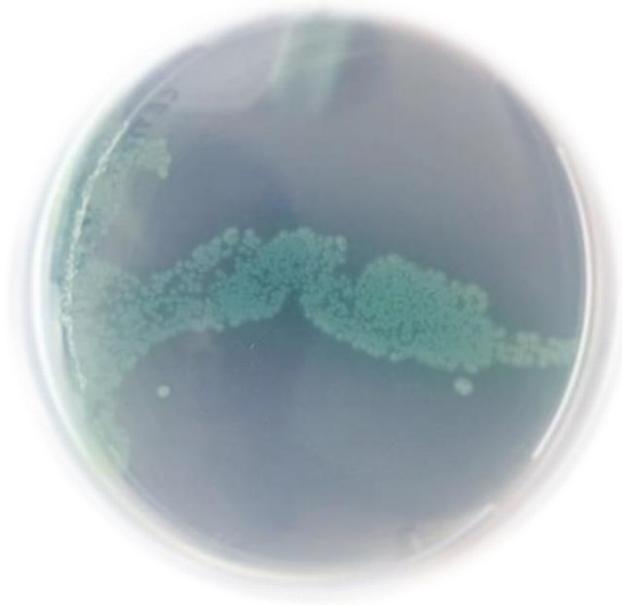


Figura 4. Crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* en agar cetrimida.

El proceso de identificación de la cepa bacteriana se realizó mediante la aplicación del kit API-20e (bioMérieux® sa, 2002), que sirve para la identificación de distintos géneros de bacterias y bacilos gram-negativo. Este kit funciona mediante 20 micro-cápsulas que contienen distintos reactivos deshidratados (Figura 5).

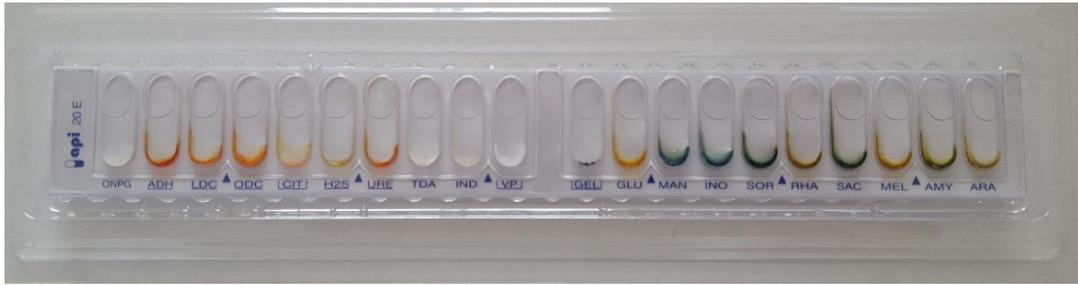


Figura 5. Kit API-20E antes de la adición de la solución bacteriana.

Estos reactivos al entrar en contacto con las bacterias producen una reacción que genera una coloración específica de la bacteria en estudio. Se considera una reacción positiva en aquellos donde ha ocurrido un cambio de color. En base a los colores generados por cada reacción y el sistema de numeración (Figura 6) para pruebas con resultados positivos se obtiene un código numérico que permite la identificación de la bacteria en estudio (Anexo 1).

VALOR ASIGNADO	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
	1 ↓	2 ↓	4 ↓	1 ↓	2 ↓	4 ↓	1 ↓	2 ↓	4 ↓	1 ↓	2 ↓	4 ↓	1 ↓	2 ↓	4 ↓	1 ↓	2 ↓	4 ↓	1 ↓	2 ↓	4 ↓
	sumar valores			sumar valores			sumar valores			sumar valores			sumar valores			sumar valores					

^a Se le asigna este número si el resultado de la prueba fue positivo; si el resultado fue negativo el valor asignado es cero.

Figura 6. Sistema de numeración de las pruebas positivas, para determinar el número de identificación de enterobacterias por el sistema de identificación bioquímica API-20E. Fuente: (Giles, 1995)

Una vez identificada y aislada la bacteria, se procedió a la obtención de un mayor número de colonias a partir de colonias aisladas en agar cetrimida.

2. Bio-aumentación y alimentación de la cepa aislada

Para el proceso de bio-aumentación se preparó una solución con agua y melaza a 300 ppm. Luego, el contenido de 2 cajas Petri con colonias de *P. aeruginosa* fue trasvasado a un recipiente de 150 ml con melaza (Figura 7). Posteriormente, el recipiente y su contenido y llevado a incubación durante 4 h a 36°C para alcanzar una aclimatación y mayor desarrollo de colonias bacterianas previo a su inoculación en el suelo. El proceso se logró a partir de la elaboración de un medio líquido, compuesto de melaza disuelta en agua a una concentración de 300 ppm (Figura 7a). El medio líquido seleccionado posee un alto contenido de carbohidratos y azúcares, los cuales permiten que la bacteria *Pseudomona aeruginosa* se desarrolle. Adicionalmente, el inóculo fue mantenido en

incubación por 4 horas a 36°C. La bio-aumentación fue verificada a partir de la diferencia entre el número de UFC agregadas al inóculo inicialmente (Figura 7b - UFC agregados al inóculo: 433×10^4 UFC (caja 1) + 68×10^5 UFC (caja 2) = $11,13 \times 10^6$ UFC) y el número de UFC después del tiempo de incubación (Figura 7c UFC después del proceso de bio-aumentación: 1031×10^6 UFC/ml).

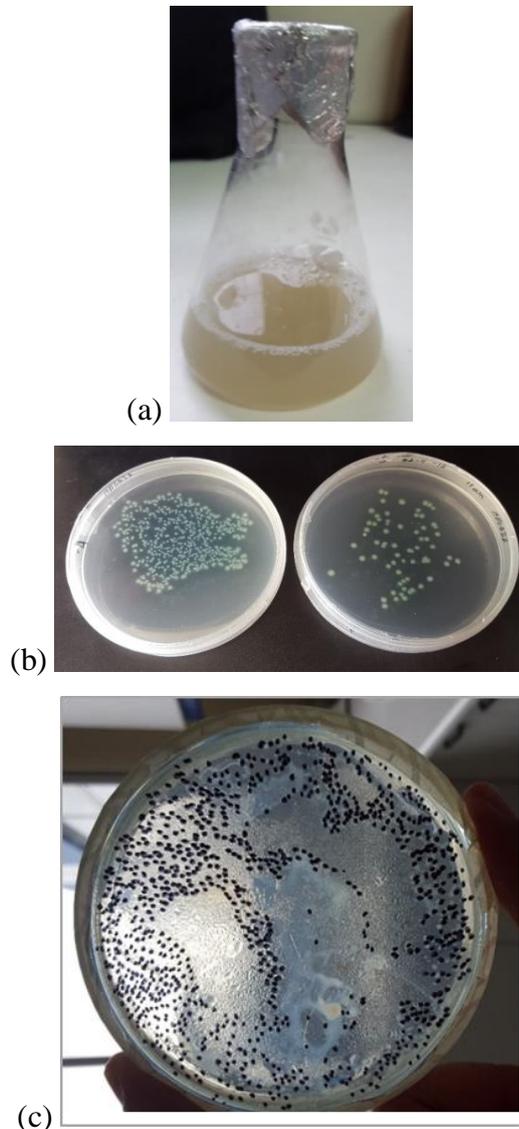


Figura 7. Bio-aumentación de *p. aeruginosa* en inóculo de melaza.

3. Preparación de suelos

Se recolectaron 25 kg de suelo en estado natural y sin contaminar con FO6 de los espacios Central Térmica Termoesmeraldas. De igual manera se colectaron 25 kg de arena de sílice comercializada por la empresa ecuatoriana Sika Ecuatoriana S.A. Antes de su uso, las muestras fueron tamizadas (2 mm) y esterilizadas en autoclave por 4 h y a 115 °C.

4. Suelo natural y arena de cuarzo

Se prepararán 3 muestras de 188 g de suelo y arena de cuarzo previamente tratadas. Cada una de las muestras se contaminó con 12 g de FO6, para obtener muestras contaminadas con 6 % en peso de FO6.

Una vez aclimatada la bacteria, y habiéndose desarrollado en el medio artificial, se procedió a agregar el inóculo en muestras contaminadas artificialmente. Por medio de una pipeta se procedió a agregar 20 ml de inóculo a muestras de suelo de 200 g contaminadas, luego se realizó un mezclado para homogenizar la dispersión del inóculo por toda la muestra. Las muestras se mantuvieron durante todo el experimento en un ambiente controlado de incubación a temperatura constante de 36°C (Figura 8 y 9).



Figura 8. Muestras mantenidas en incubación a 36°C.



Figura 9. Muestras inoculadas de suelo contaminadas con FO6 e inoculadas con *P. aeruginosa*.

5. Diseño Experimental

Para el registro de los ERD se registraron 10 veces consecutivas los ERD sin modificar la posición de la muestra, luego la muestra se rotará 90° y se registraron nuevamente un total de 10 espectros, así prosiguió así sucesivamente hasta registrar 40 espectros por cada muestra.

Las muestras de suelo y sus dos replicas, así como, la muestra de arena de cuarzo y sus dos replicas, una vez que fueron contaminadas con FO6, en el día 0 se inocularon con *P. aeruginosa*. Para el monitoreo de la biorremediación, se midió la cantidad de hidrocarburo (*CH*) en las seis muestras, usando el ERD y el indicador de hidrocarburos UNACH (*IHU*) por cinco días consecutivos (los días 0, 7, 14, 21 y 23); después de haber sido inoculadas con *P. aeruginosa*. En la Tabla 3 se lista el número total de ERD registrados.

Tabla 3. Número total de Espectros de Reflectancia Difusa registrados para cada material analizado.

Posición Angular	Registros repetidos del espectros (repeticiones)	Espectros por muestra	Nº de muestras	Nº de espectros por día	Días de monitoreo	Nº total espectros
0º	10					
90º	10					
180º	10					
270º	10	40	6	40*6 = 240	5	5*240 = 1200

6. Determinación de la cantidad de hidrocarburos usando el Índice de Hidrocarburos UNACH.

El Índice de hidrocarburos UNACH (*IHU*) se fundamenta en la firma espectral del FO6 en el ERD (Cedeño, 2017). El algoritmo y ecuaciones desarrollaron en Cedeño (2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Asilamiento, identificación, bioaumentación e inoculación

La disolución en solución salina de 1 g de suelo contaminado y posterior cultivo en cajas petri con agar cetrimida en diluciones de 10^{-3} hasta 10^{-5} permitió el aislamiento de bacterias del genero *pseudomona*. La identificación de la cepa aislada usando el kit API20E confirmó que la cepa aislada fue *aeruginosa*.

En la Figura 10, se puede observar las coloraciones adoptadas por los diferentes reactivos en el kit de identificación. Una vez identificados los códigos correspondientes a cada coloración, estos se usaron como datos de entrada en un macro que se encuentra en la pag <http://www.biomerieux-usa.com/clinical/api>. Los resultados de este macro confirmaron qué la combinación de colores obtenida correspondió en un 99.7 % a la *P. aeruginosa* (Figura 11).

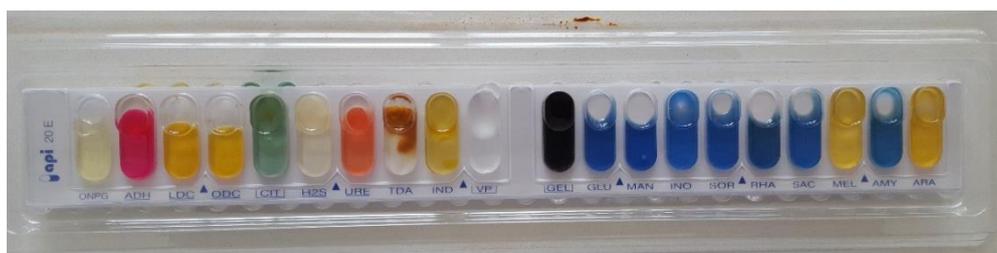


Figura 10. Kit API-20E, se muestran las reacciones producidas por la actividad bacteriana.

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.7	0.76	URE 25%	GEL 75%	ARA 25%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra		
<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	0.2	0.32	URE 0%	GLU 25%	ARA 20%

Figura 11. Resultados de la introducción del código en el sistema web para la prueba API-20E.

Mediante el inóculo de melaza se logró que las unidades formadoras de colonias aumentara significativamente de $11,13 \times 10^6$ UFC a 1031×10^6 UFC/ml después de 4 horas de incubación a 36°C . Este resultado confirma que el inóculo de melaza es muy conveniente para la bio-aumentación de *pseudomona aeruginosa*. Una vez obtenido el inóculo, se dispersaron homogéneamente 20 ml de este en cada una de las muestras contaminadas.

2. Registro del espectro de reflectancia difusa

Arena de cuarzo

En la Figura 12, se representa el ERD de tres muestras de AC en su estado natural y completamente secas. Se puede apreciar que la reflectancia aumenta en la medida que la longitud de onda aumenta, en correspondencia con una disminución de la absorción en esta región del espectro electromagnético. Este resultado es similar al obtenido por Cedeño (2017) en muestras de arena de cuarzo completamente secas.

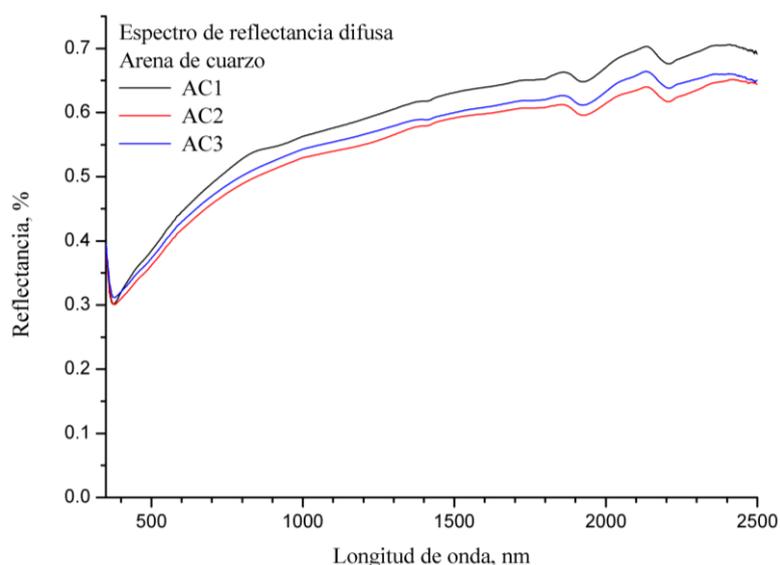


Figura 12. Espectros de reflectancia difusa de muestras de arena de cuarzo en su estado natural.

Arena de cuarzo + fueloil 6 (6%)

En la Figura 13, se representa el ERD de la AC + FO6 (6%). En esta Figura, se puede observar que la reflectancia se mantiene muy baja en un rango de longitudes de onda de 350 nm a 1000 nm, debido a que el FO6 es un gran absorbente de radiación electromagnética en la región del visible del espectro electromagnético. Posteriormente, la reflectancia aumenta progresivamente en la medida que la longitud de onda aumenta.

Sin embargo, existen dos mínimos parciales en el ERD que se manifiestan a 1700 nm y 2300 nm. Estos mínimos corresponden con tonos y sobre tonos de absorción del FO6. Resultados similares fueron reportados por (Asadzadeh y de Souza Filho, 2017; Cedeño, 2017; Cloutis, 1989; Hörig *et al.*, 2001) en la detección de bandas de absorción de enlaces C-H.

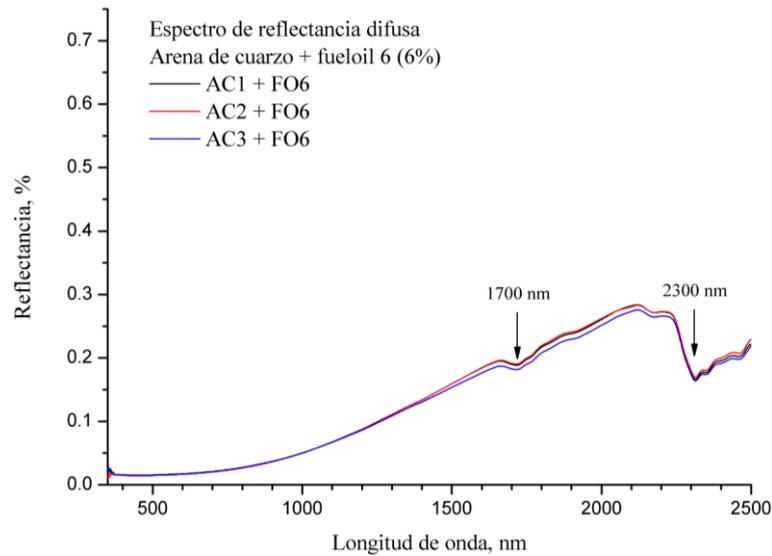


Figura 13. Espectro de reflectancia difusa de muestras de arena de cuarzo + Fueloil 6 al 6 % p/p.

Arena de cuarzo + fueloil 6 (6%) + melaza

En la Figura 14, se representan los ERD de tres muestras de AC+FO6(6%)+Melaza. En esta Figura, se aprecia que existe muy baja reflectividad en la región del visible debido a la naturaleza opaca del FO6. También, se aprecia que existen dos mínimos parciales a 1700 nm y 2300 nm característicos del FO6. En términos globales, se puede apreciar una reducción en la reflectividad cuando se agrega la melaza.

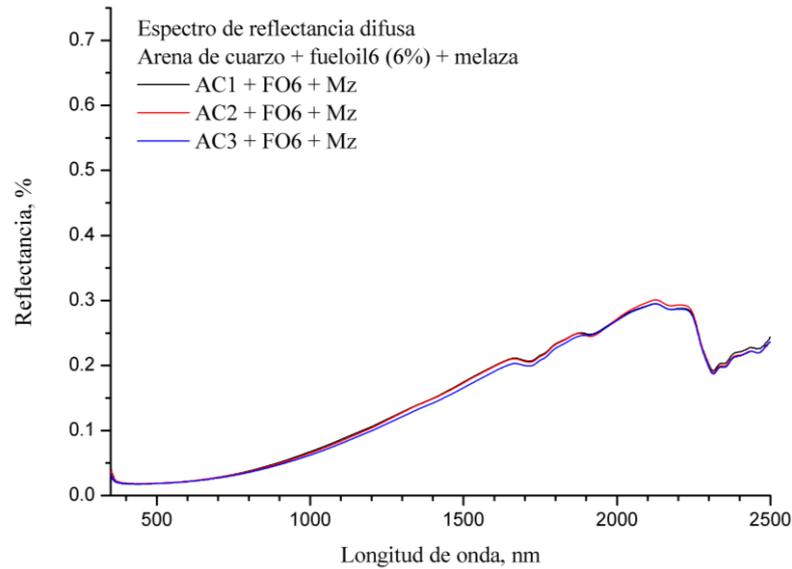


Figura 14. Espectro de reflectancia difusa para muestras de AC + FO6 al 6% + Melaza.

Arena de cuarzo + fueloil 6 (6%) + melaza + p. aeruginosa.

En la Figura 15, se representa el ERD registrado en tres muestras de AC+FO6(6%)+Melaza+ *P. aeruginosa*. En el ERD se aprecia que existe muy reflectividad en la región del visible debido a la naturaleza opaca del FO6. También, se aprecia que existen dos mínimos parciales a 1700 nm y 2300 nm característicos del FO6. Sin embargo, se observan dos mínimos prominentes a 1400 nm y 1900 nm que corresponden con picos de absorción del agua y grupos OH⁻.

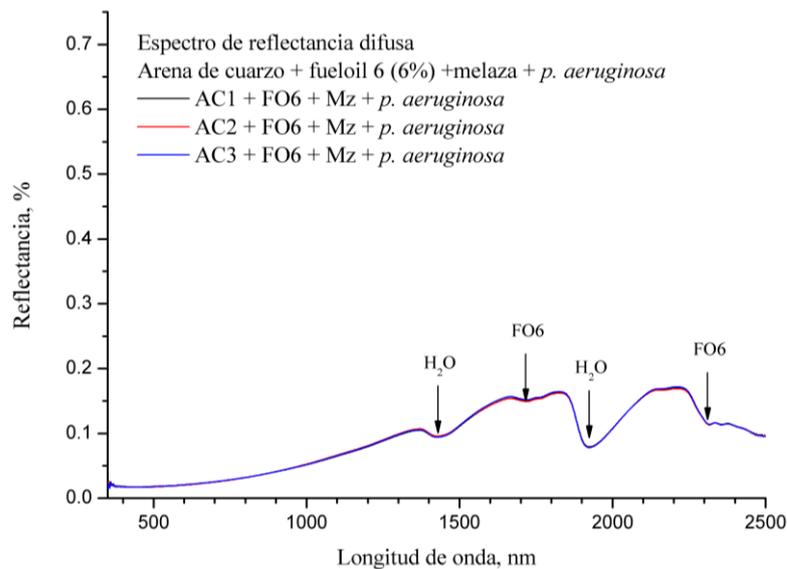


Figura 15. Registro del espectro de reflectancia difusa para muestras de AC + FO6 al 6% + Melaza + *p. aeruginosa* el día 0.

Suelo natural

En la Figura 16, se muestra el ERD de muestras de SN. En esta Figura, se aprecia que la reflectancia aumenta en la medida que la longitud de onda incrementa, alcanza un máximo alrededor de los 1800 nm y comienza a disminuir en la región de valores de longitud de onda mayores a 1800 nm. Se observan dos mínimos prominentes a 1400 nm y 1900 nm que corresponden con picos de absorción del agua y grupos OH⁻. Resultados similares fueron reportados por Cedeño (2017) en muestras del mismo tipo de suelo.

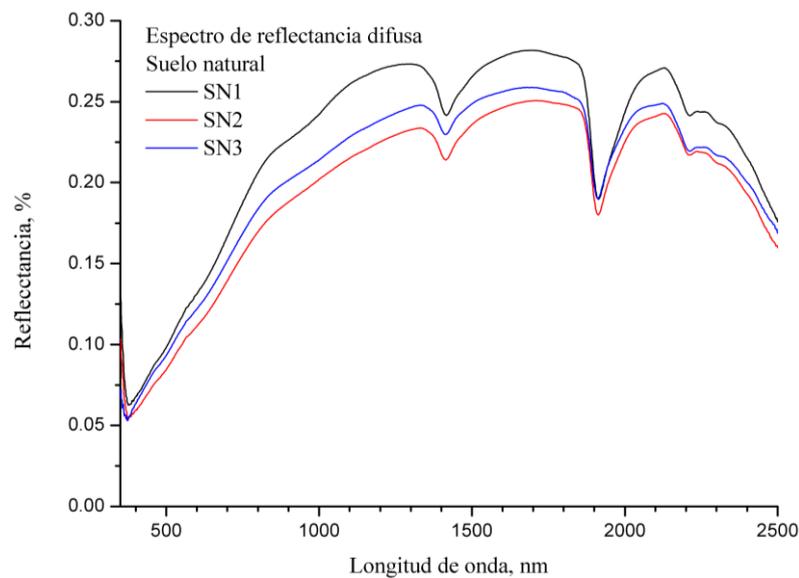


Figura 16. Espectro de reflectancia difusa para muestras de suelo natural.

Suelo natural + fueloil 6 (6%)

En la Figura 17, se observar una disminución global en la reflectancia cuando se compara con el ERD en la Figura 16 (sin FO6). Sin embargo, es notable que la región en el ERD que va de 2200 nm a 2300 nm se desarrolla de una manera diferentes a como se desarrolla en la Figura 16. Se observan dos mínimos parciales a 1700 nm y 2300 nm en correspondencia a la firma espectral del FO6 (Cedeño 2107).

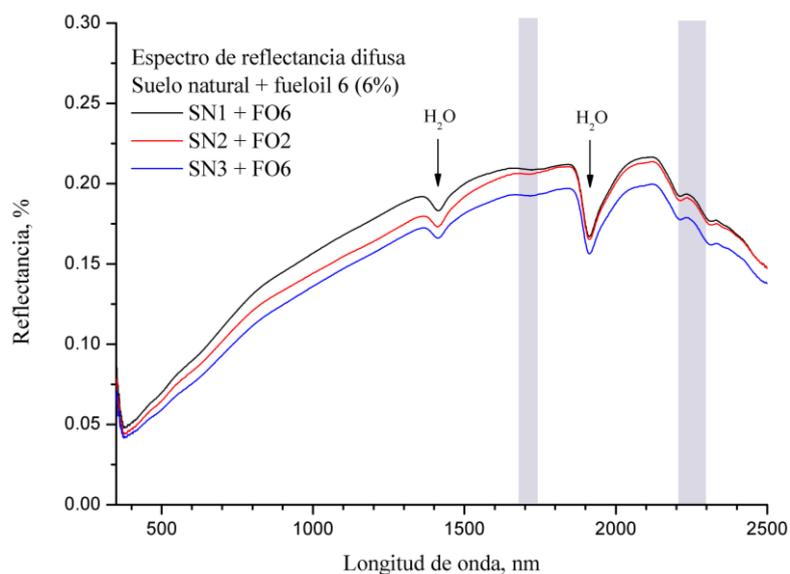


Figura 17. Registro del espectro de reflectancia difusa para muestras de SN + FO6 (6%).

Suelo natural + fueloil 6 (6%) + melaza

En la Figura 18 se muestra el ERD de las muestras de SN+FO6+ML. En esta figura, se aprecia una disminución global de los valores de reflectancia, los mínimos parciales debidos al agua y todas las características que exhiben los ERD en la Figura 17. No son apreciables características que se puedan atribuir a una posible firma espectral de los constituyentes de la melaza.

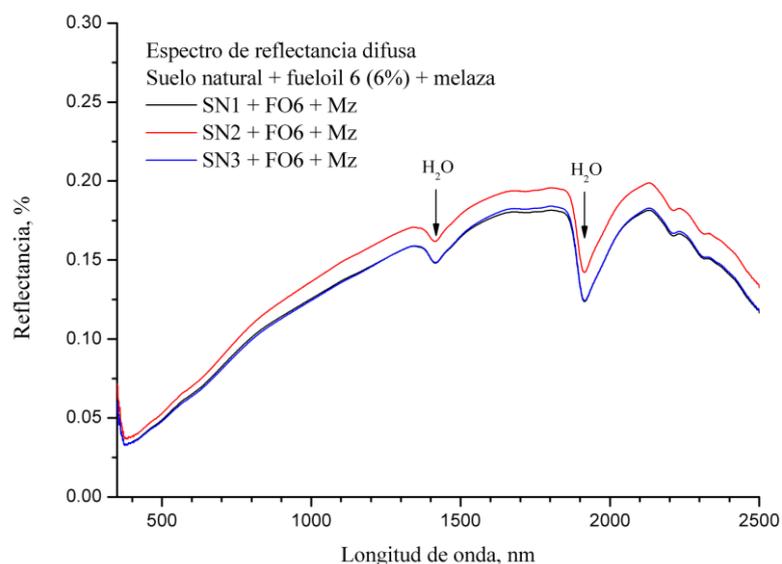


Figura 18. Espectro de reflectancia difusa para muestras de SN + FO6 (6%) + Melaza.

Suelo natural + fueloil 6 (6%) + melaza + p. aeruginosa

El ERD de las muestras de SN + FO6 + ML + *p. aeruginosa* se muestra de la Figura 19. De manera similar, como ocurrió en las muestras de arena de cuarzo (Figura 15), los valores de reflectancia *no* se ven afectados ante la presencia de *p. aeruginosa*, y la variación más significativa se ve producida por la humedad agregada con la inoculación.

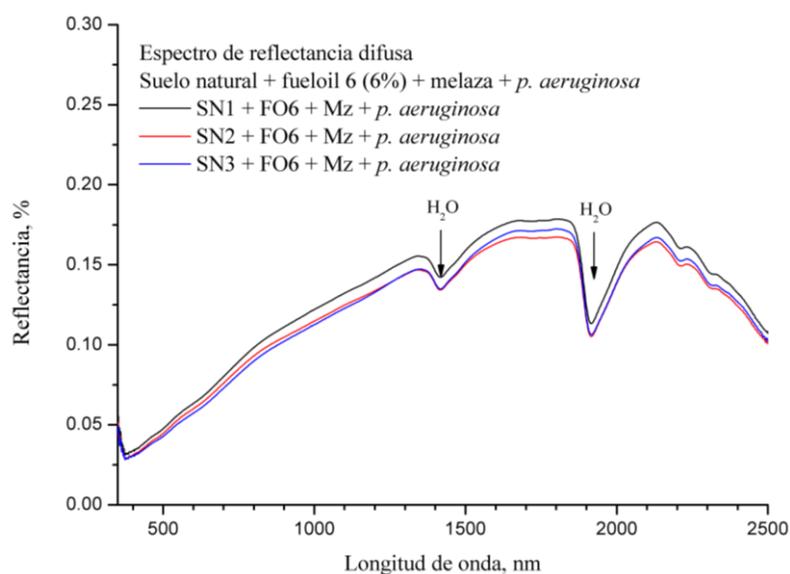


Figura 19. Espectro de reflectancia difusa de muestras de SN + FO6 al 6% + Melaza + *P. aeruginosa* el día 0.

3. Monitoreo de la biorremediación

Arena de Cuarzo.

Siguiendo el procedimiento delineado en la metodología, se calculó el *IHU* y *CH*, con el propósito de monitorear la biorremediación de las muestras de AC contaminadas con FO6, una vez inoculadas con *p. aeruginosa*. En la Tabla 4 se muestran los valores del *IHU* para cada replica, así como su valor promedio una vez transcurrido 0, 7, 14, 21 y 23 días de la inoculación (Tabla 4). Se puede apreciar que los valores del *IHU* disminuyen en la medida que aumenta los días transcurridos después de la inoculación, en correspondencia con la biodegradación del FO6. Los valores calculados de la *CH* se listan en la Tabla 5, donde se evidencia que el *CH* en las muestras se ha reducido en promedio en un 13,6 % en 23 días. Este valor bajo de remoción se puede deber, entre otros factores, a la naturaleza inerte del de la AC y a un valor desfavorable del pH. Púes, el proceso de biodegradación es controlado por la temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes como N y P, entre otros (DARSA 2014)

Tabla 4. Cálculo del *IHU* en muestras de arena de cuarzo contaminadas con FO6.

Réplicas	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 23
1	48,030	47,847	45,075	43,111	42,491
2	48,066	47,327	44,261	43,651	43,322
3	49,297	49,496	46,634	45,074	44,485
Valor medio <i>IHU</i>	48,464	48,224	45,324	43,946	43,433

Tabla 5. Valores de *CH* calculado en muestras de arena de cuarzo contaminadas con Fuegoil 6.

Réplicas	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 23
1	5,2490	5,2220	4,8187	4,5406	4,4542
2	5,2543	5,1454	4,7027	4,6165	4,5702
3	5,4379	5,4679	5,0439	4,8186	4,7345
Promedio <i>CH</i> *	5,3137 (0,1076) a	5,2784 (0,1685) a	4,8551 (0,1735) b	4,6586 (0,1437) b	4,5863 (0,1408) b

*Entre parentesis se expresa la desviación estandar. Letras iguales se interpretan como que no existen diferencias significativas.

En la Figura 20, se muestra el ERD de la AC contaminada con FO6 e inoculada con *p. aeruginosa*, registrados a 0, 7, 14, 21 y 23 días después de la inoculación. Se puede apreciar como la reflectancia global aumenta en la medida que la biodegradación progresa. Los mínimos de reflectancia a 1400 nm y 1900 nm correspondientes a tonos de absorción del agua y grupos OH- desaparecen con el tiempo. Estos resultados sugieren que el medio en que se encuentran las *p. aeruginosa* en las muestras de AC+FO6+Mz+ *p. aeruginosa* no están favoreciendo la biodegradación del FO6. Entre los factores que el valor del pH del medio (DARSA 2014).

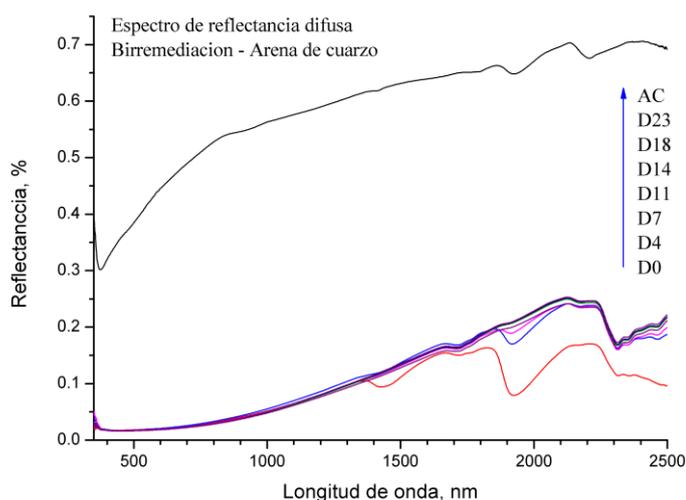


Figura 20. Registro de los espectros de reflectancia difusa en muestras de arena de cuarzo en estado natural (AC), contaminadas con FO6 e inoculadas con *p. aeruginosa* una vez transcurrido 0, 4, 7, 11, 14, 18 y 23 días de su inoculación.

Suelo natural

En la Tabla 6, se muestran los valores del *IHU* para cada muestra, así como su valor promedio una vez transcurrido 0, 7, 14, 21 y 23 días de la inoculación. Se puede apreciar que los valores del *IHU* disminuyen en la medida que aumenta los días transcurridos después de la inoculación. Lo que sugiere que las pseudomonas están *biodegradando* el FO6. Los valores calculados de la *CH* se listan en la Tabla 7. En esta Tabla se aprecia que la cantidad de hidrocarburo en las muestras de suelo contaminadas con FO6 disminuyó 45.8 % en los 23 días de ensayo. DAS (2011) reportó que la *p. aeruginosa* en su ciclo catabólico produce Rhamnolips, un enzima considerada biosurfactante que le permite tomar el carbono del hidrocarburo.

Tabla 6. Cálculo del *IHU* para las muestras de suelo contaminadas con FO6.

Réplicas	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 23
1	13,282	10,863	9,722	9,308	8,495
2	12,832	9,494	9,608	9,165	8,533
3	13,548	11,190	9,511	9,126	8,401
Valor medio <i>IHU</i>	13,221	10,516	9,614	9,200	8,476

Tabla 7. Valores del *CH* calculado para las muestras de suelo contaminadas con FO6

Réplicas	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 23
1	5,099	3,885	3,333	3,136	2,754
2	4,868	3,224	3,278	3,068	2,772
3	5,236	4,045	3,232	3,050	2,710
Valor medio <i>CH</i>	5,068 (0,1860) a	3,718 (0,4352) b	3,281 (0,0506) bc	3,085 (0,0454) c	2,745 (0,0319) c

*Entre parentesis se expresa la desviación estandar. Letras iguales se interpretan como que no existen diferencias significativas.

En la Figura 21, se muestra el ERD del SN contaminado con FO6 e inoculada con *p. aeruginosa*, registrado a 0, 7, 14, 21 y 23 días después de la inoculación. Se aprecia en la Figura 26 que la reflectancia aumenta en la medida que transcurren más días después de la inoculación. La biorremediación hace que el ERD se más similar al suelo natural sin contaminar.

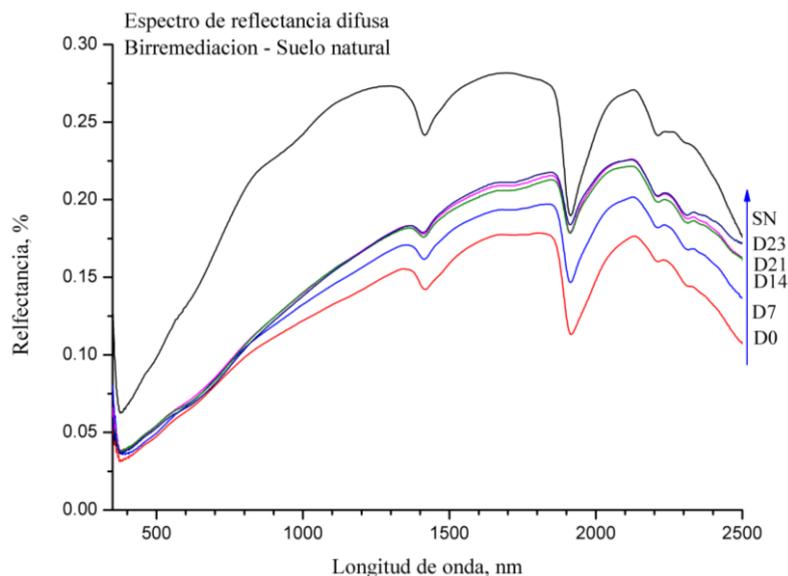


Figura 21. . Registro de los espectros de reflectancia difusa en muestras de suelo natural (SN), contaminadas con FO6 e inoculadas con *p. aeruginosa* una vez transcurrido 0, 4, 7, 11, 14, 18 y 23 días de su inoculación.

4. Firma espectral de la Melaza

En la Figura 22, Se muestra el ERd de la melza que resultó de la subtracción del espectro AC del espectro de AC+MZ. Aunque, en el ERD de la melza no se aprecian características que puedan ser atribuidas a la interacción de la radiación con las moléculas de los componentes de la melaza, en el espectro que resultó de la primera derivada del ERd de la melaza, se aprecian mínimos a 1140 nm y 1750 nm que se atribuyen a la melaza (Figura 22).

La melaza es aproximadamente 60 a 63 % p/p en azúcares (principalmente sacarosa), 6 a 9 % p/p en peso de glucosa o dextrosa, 5 – 10 % p/p de fructosa y no azucars. La sacarosa contiene un gran número de unidades de CH₂ y sus tonos de “stretching” fueron reportados por Cloutis (1989) en la región alrededor de 1750 nm.

5. Firma espectral de la *p. aeruginosa*

En la Figura 23, se muestra el ERD de la *p. aeruginosa* obtenido de la sustracción del espectro de AC+FO6+Mz del espectro AC+FO6+Mz+ *p. aeruginosa* en día 0. Con la ayuda de la primera derivada del ERD de la *p. aeruginosa* se encontraron características que son atribuidas a la interacción de la *p. aeruginosa* con la radiación electromagnética (1690 nm, 2140 nm y 2260 nm). En particular a longitudes de onda mayores a 2300 nm

el ERD se desarrolla de una manera que es atribuible a la *p. aeruginosa*. Cloutis (1989) reportó que en estas regiones se manifiestan tonos y sobre tonos de absorción de grupos funcionales CH₂ y CH₃.

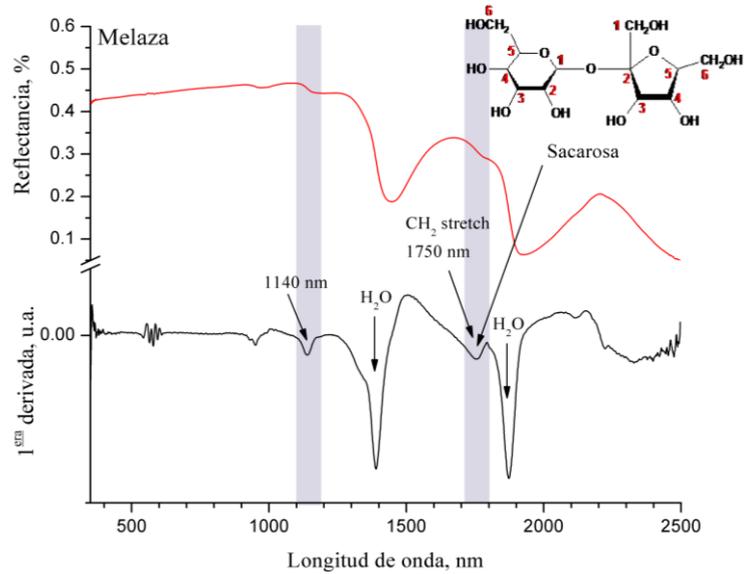


Figura 22. Espectro de reflectancia difusa de la melaza y su primera derivada.

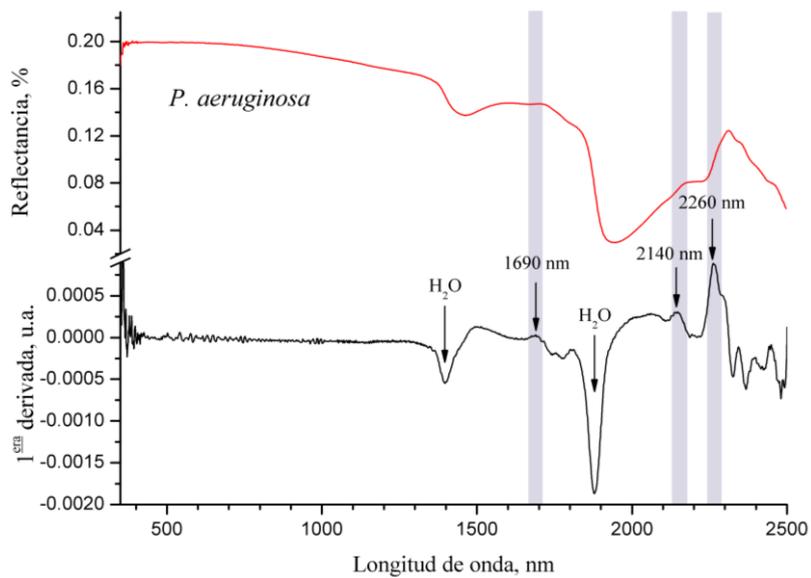


Figura 23. Espectro de reflectancia difusa de la *pseudomona aeruginosa* y su primera derivada.

CONCLUSIONES

La *Pseudomona aeruginosa* se puede emplear como agente de biorremediación y usar en la restauración de ecosistemas contaminados con fueloil 6.

El proceso de biorremediación representa una solución técnica viable para la disposición y saneamiento de los suelos contaminados con fueloil 6, ya que la tasa de recuperación fue de 45.8 % en un tiempo de 23 días, siendo necesario para ello una inversión mínima inicial.

Los resultados confirman que el inóculo de melaza es muy conveniente y práctico para la bio-aumentación de *pseudomona aeruginosa*.

La metodología usada para la bioaumentación mostro tener un gran potencial para la remediación de suelos contaminados con fueloil 6. Eliminación efectiva de contaminantes se puede obtener usando inóculos microbianos aislados del ambiente donde ha ocurrido la contaminación por un largo período de tiempo. Una bioaumentación exitosa depende fuertemente de la habilidad del inóculo de sobrevivir en suelos contaminados.

Le tratamiento de los espectros de reflectancia difusa registrados permitió encontrar elementos de la firma espectral de la melaza y de la *pseudomona aeruginosa*. Estos resultados pueden ser importantes en aplicaciones prácticas que implique el control y dosificación de la melaza, así como la distinción y conteo unidades formadoras de colonias de *pseudomona aeruginosa* usando la reflectancia difusa.

La reflectancia difusa es una tecnología prometedora para el desarrollo de técnicas portátiles y satelitales orientadas al monitoreo de la biorremediación de suelos contaminados con fueloil 6.

RECOMENDACIONES

1. Ampliar los estudios orientados a la identificación de la firma espectral de los microorganismos biodegradadores de hidrocarburos del petróleo para obtener nuevas tecnologías de monitoreo de procesos de birremediación.
2. En los procesos de biorremediación se involucran un gran número de factores físicos, químicos y ambientales que puede afectar seriamente el proceso de biodegradación del hidrocarburo del petróleo, así, se recomienda la ampliación de los estudios que permitan optimizar las condiciones para una biodegradación más eficiente y efectiva de los hidrocarburos.
3. Profundizar en estudios orientados a la identificación de la relación entre el tipo de suelo y el biotratamiento más conveniente para el logro de la birremediación.

BIBLIOGRAFÍA

- Asadzadeh, S., & Roberto de Souza Filho, C. (2017). Spectral remote sensing for onshore seepage characterization: A critical overview. *Earth-Science Reviews*, 168.
- Benavides, J., Mesa, L. De, Quintero, G., Liliana, A., Vizcaíno, G., & Jaimes, D. C. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5), 82–90. Retrieved from http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTREVIS1_5.pdf
- bioMérieux® sa. (2002). *API-20 E (Ref 20 100 / 20 160)*. Marcy-l'Etoile, France. Retrieved from <http://www.biomerieux.com>
- Cedeño, A. (2017). *Desarrollo de una metodología basada en reflectancia difusa para evaluar suelos contaminados con fuel oil 6*. Universidad Nacional de Chimborazo.
- Cloutis, E. A. (1989). Spectral reflectance properties of hydrocarbons: remote-sensing implications. *Science*, 245(4914), 165–168. <https://doi.org/10.1126/science.245.4914.165>
- Gabari, V., & Fernandez, J. (2011). Evaluación del Riesgo para la Salud Humana en Suelos Agrícolas del Entorno de Mina Sotiel (Huelva), 48–50.
- Gil, I. (2013, June 13). ¿Por qué hay un derrame petrolero por semana en Ecuador? ¿Por Qué Hay Un Derrame Petrolero Por Semana En Ecuador? Retrieved from http://www.bbc.com/mundo/noticias/2013/06/130610_ciencia_ecuador_derrame_ri_o_limpieza_ig
- Giles, M. (1995). *Estudio sobre las interacciones microbianas importantes para el incremento de proteína durante la fermentación del pozol*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Giraldo, J. D. (2012). *Producción de ramnolípidos por pseudomonas aeruginosa Pb 25 : evaluación de su actividad emulsificante y de remoción de metales pesados*. *Microbiología y Parasitología*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Retrieved from http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1413/1/Giraldo_zj.pdf
- Gómez Romero, S., Gutiérrez Bustos, D., Hernández Marín, A., Hernández Rodriguez, C., Losada Casallas, M., & Mantilla Vargas, P. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *JuNiO De*, 6(9), 101–212.
- Hernández Acosta, E., Rubiños Panta, J. Enrique, & Alvarado López, J. (2004).

- Restauración de suelos contaminados con hidrocarburos: Conceptos Básicos, (January 2004), 148. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/272679969>
- Hörig, B., Kühn, F., Oschütz, F., & Lehmann, F. (2001a). HyMap hyperspectral remote sensing to detect hydrocarbons. *International Journal of Remote Sensing*, 22(8), 1413–1422. <https://doi.org/10.1080/01431160120909>
- Hörig, B., Kühn, F., Oschütz, F., & Lehmann, F. (2001b). Hyperspectral remote sensing to detect hydrocarbons. *International Journal of Remote Sensing*, 22(September 2012), 1413–1422.
- Lillesand, T., Kiefer, R. W., & Chipman, J. (2015). *Remote Sensing and Image Interpretation*. Retrieved from <https://www.wiley.com/en-us/Remote+Sensing+and+Image+Interpretation%2C+7th+Edition-p-9781118343289>
- Naranjo, C. (2017). *Aislamiento e identificación de microorganismos con capacidad de degradar hidrocarburos en suelos contaminados de la comunidad Lumbaqui, provincia de Sucumbios*. Universidad de las Américas. Retrieved from <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/7458/1/UDLA-EC-TIB-2017-23.pdf>
- Ortiz, E., Núñez, R., Fonseca, E., Oramas, J., Almazán, V., Cabranes, Y., ... Borges, G. (2005). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Contribución a La Educación Y La Protección Del Medio Ambiente ISBN 978-959-7136-56-9*, 6(6), 51–60.
- Ortiz, I., Sanz, J., Dorado, M., & Villar, S. (2007). Técnicas de recuperación de suelos contaminados. ... *Universidad de Alcalá. Dirección General de ...*, 109. Retrieved from [http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:T?cnicas+de+recuperaci?n+de+suelos+contaminados#0](http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:T?cnicas+de+recuperaci?n+de+suelos+contaminados#0%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:T?cnicas+de+recuperaci?n+de+suelos+contaminados#0)
- Riesco, R. A., & Vallès, C. (2012). Recuperación de suelos contaminados, 248. Retrieved from <http://www.jaravalencia.com/docu/suelconthidroc.pdf>
- Rodríguez, G. S., & Júnior, M. de A. S. (2013). Anais XVI Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 13 a 18 de abril de 2013, INPE. *Anais XVI Simposio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR, Foz Do*

- Iguaçu, PR, Brasil, 13 a 18 de Abril de 2013, INPE, (1986), 6917–6922.*
<https://doi.org/10.1590/S1413-81232013000100006>
- Sampieri, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2010). *Metodología de la investigación* (Quinta).
- Santa, J., Serrano, M., & Stashenko, E. (2002). *Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de hidrocarburos presentes en aguas residuales industriales.* Universidad Industrial de Santander. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-53832002000100005
- Scheibenbogen, K., Zytner, R., Lee, H., & Trevors, J. (1994). Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 59(1), 53–59. <https://doi.org/10.1002/jctb.280590109>
- Todd, G. D., Chessin, R. L., & Colman, J. (1999). Toxicological Profile for Total Petroleum Hydrocarbons (TPH). *Total Petroleum Hydrocarbons*, (Who 1982), 17–38.
- Villamizar, J. R. (2015). Sistemas multiespectrales e hiperespectrales para la observación del territorio. análisis y aplicación a la prospección de hidrocarburos, 177.

ANEXOS.

ANEXO 1. Tabla de lectura para las pruebas bioquímicas del sistema API 20e

Pruebas	Sustratos	Reacciones/enzimas	Resultados	
			Negativo	Positivo
<u>ONPG</u>	Ortonitrofenol-β-galactosido	B-galactosidasa	inoloro	Amarillo (1)
<u>ADH</u>	arginina	Arginina dehidrolasa	amarillo	Rojo/naranja (2)
<u>LDC</u>	lisina	Lisina descarboxilasa	Amarillo	Naranja
<u>ODC</u>	ornitina	Ornitina descarboxilasa	Amarillo	Rojo/naranja (2)
<u>CIT</u>	Citrato sódico	Utilización de citrato	Verde pálido/amarillo	Azul-verde/verde(3)
<u>H₂S</u>	Tiosulfato sódico	Producción de H ₂ S	Inoloro/grisáceo	Depósito negro
<u>URE</u>	Urea	Ureasa	amarillo	Rojo/naranja
TDA	triptofano	Triptofano deaminasa	TDR/lectura inmediata después de agregar el reactivo TDA (5)	
			amarillo	Marrón oscuro
IND	triptotano	Producción de indol	IND/lectura 2 min después de agregar el reactivo IND (5)	
			amarillo	Anillo rojo
<u>VP</u>	Piruvato sódico	Producción de acetoína	VP1 MAS vp2/ lectura 10 min después de agregar los reactivos VP1 y VP2 (5).	
			Inoloro	Rosado/rojo
<u>GEL</u>	Gelatina de Kohn	gelatinasa	No hay difusión de pigmento negro	Difusión de pigmento negro
GLU	Glucosa	Fermentación/oxidación(4)	Azul/azul-verdoso	Amarillo
MAN	Manitol	Fermentación/oxidación(4)	Azul/azul-verdoso	Amarillo
INO	Inotisol	Fermentación/oxidación(4)	Azul/azul-verdoso	Amarillo
SOR	sorbitol	Fermentación/oxidación(4)	Azul/azul-verdoso	Amarillo
RHA	Ramnosa	Fermentación/oxidación(4)	Azul/azul-verdoso	Amarillo
SAC	Sacarosa	Fermentación/oxidación(4)	Azul/azul-verdoso	Amarillo
MEL	Melibiosa	Fermentación/oxidación(4)	Azul/azul-verdoso	Amarillo
AMY	Amigdalina	Fermentación/oxidación(4)	Azul/azul-verdoso	Amarillo
ARA	arabinosa	Fermentación/oxidación(4)	Azul/azul-verdoso	Amarillo

- (1). Un amarillo muy pálido debe considerarse como positivo.
- (2) un color naranja después de 24h de incubación debe considerarse como negativo.
- (3) La lectura debe hacerse en la cúpula (aerobiosis).
- (4) la fermentación empieza en la parte inferior de los tubos, la oxidación en la cúpula.
- (5) TDA: Cloruro férrico; IND: Reactivo de Kovac's; VP1: Hidróxido de potasio 40%; VP2:α-naftol.

ANEXO 2. Reactivos: VP1: Hidróxido de potasio 40%.TDA: Cloruro férrico 10%; IND: Reactivo de Kovac's.



Fuente: Autor

ANEXO 3. Extracción de muestras para identificación mediante sistema API 2e.



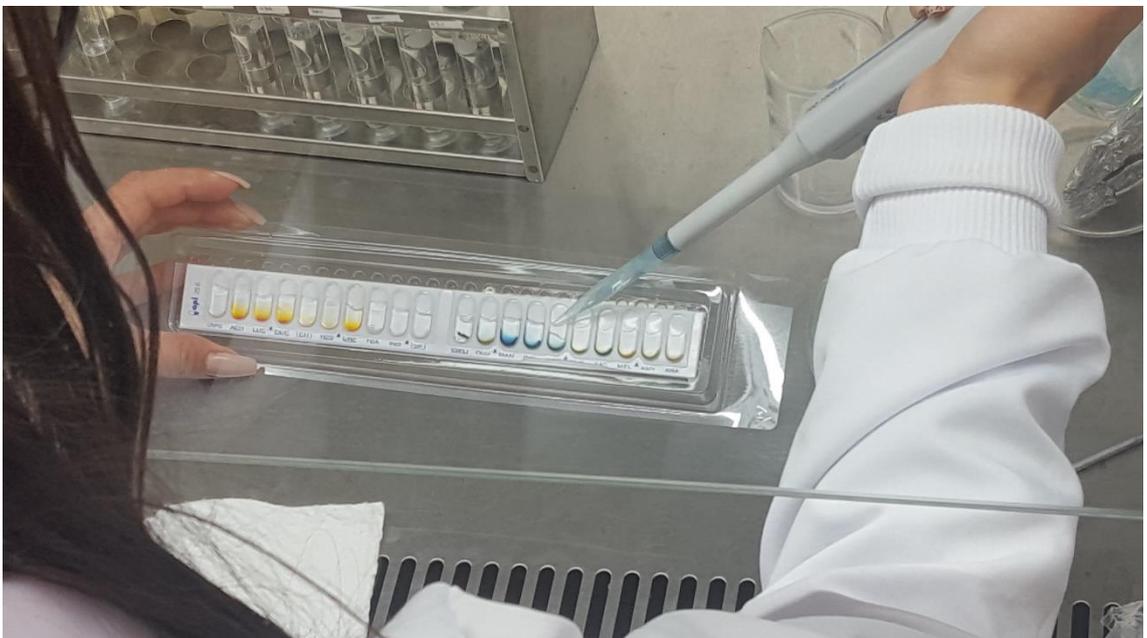
Fuente: Autor

ANEXO 4. Introducción del aspado de la muestra en solución salina.



Fuente: Autor

ANEXO 5. Aplicación del medio de solución salina con microorganismos en el kit API 20-e.



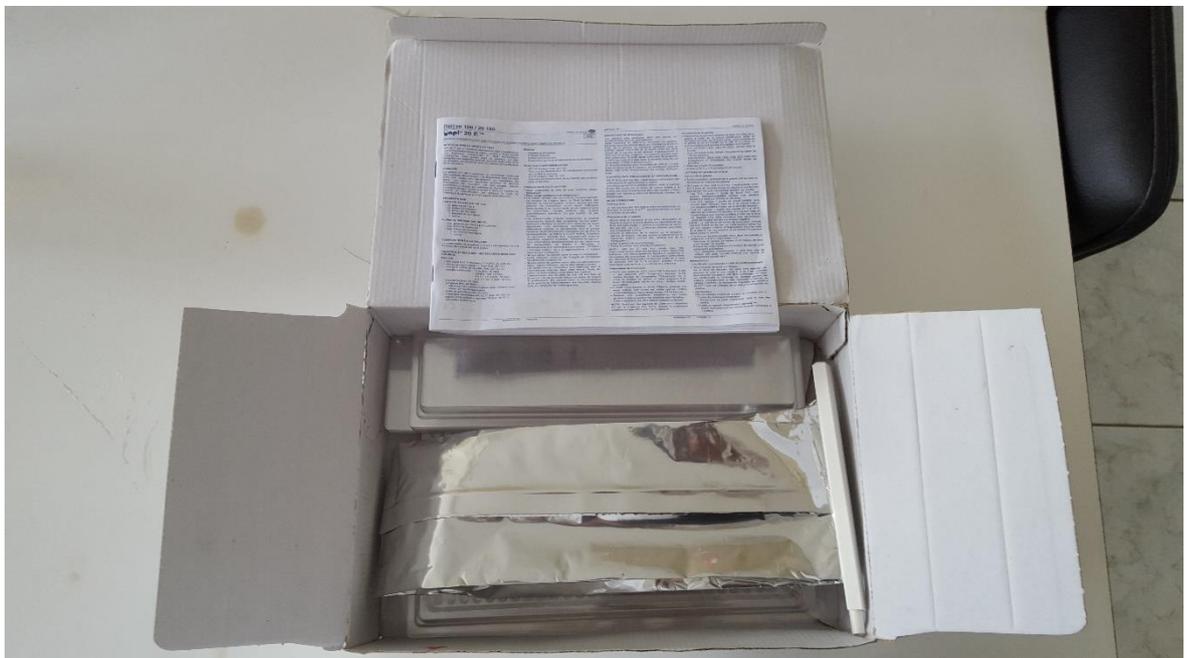
Fuente: Autor

ANEXO 6. Aplicación de reactivo TDA (Cloruro Férrico 10%) para lectura de reacción,



Fuente: Autor

ANEXO 7. Presentación del kit API 20E.



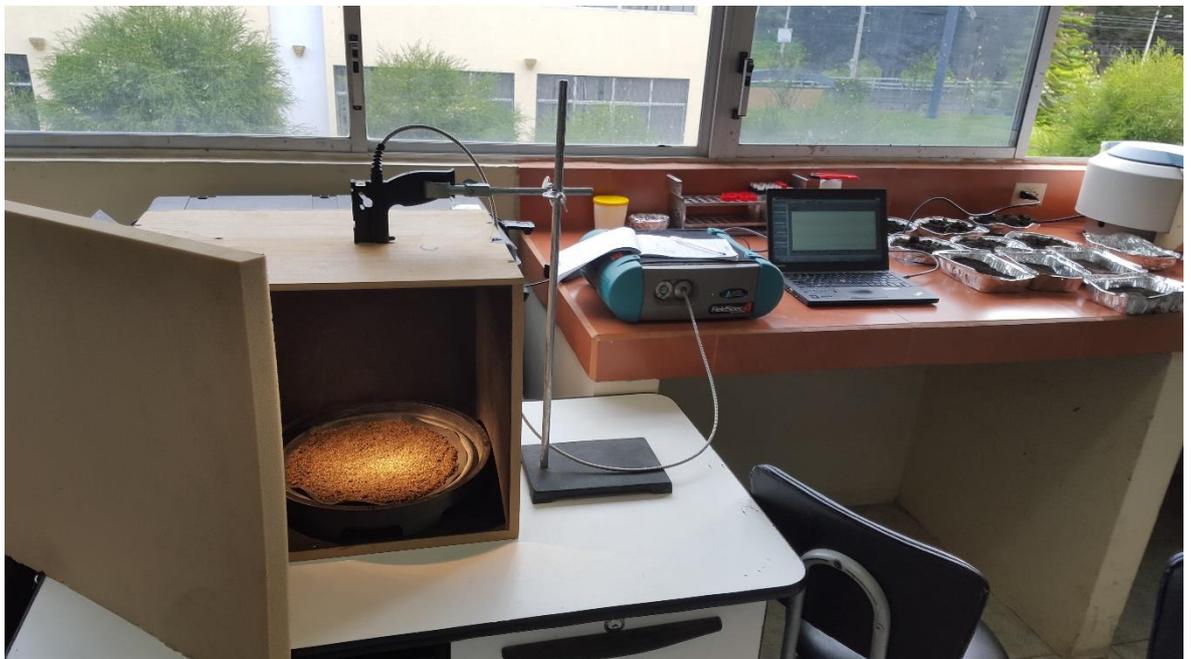
Fuente: Autor

ANEXO 8. Preparación de agar cetrimida para cultivo de bacterias del género *Pseudomona*.



Fuente: Autor.

ANEXO 9. Equipo de radiometría para medición de ERD's, en muestras de suelo y arena de cuarzo.



Fuente: Autor

ANEXO 10. Cambio de coloración en el proceso de contaminación controlada con Fo6 en arena de cuarzo.



Fuente: Autor

ANEXOANEXO 11. Cambio de coloración en el proceso de contaminación controlada con Fo6 en suelo natural.



Fuente: Autor