



ESPAMMFL

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA
AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LÓPEZ

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:
INGENIERO EN MEDIO AMBIENTE**

TEMA:

**COMPOSICIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES
AUTÓCTONOS DE UN SUELO CONTAMINADO POR
HIDROCARBUROS**

AUTOR:

DARÍO FABIÁN VERA CEDEÑO

TUTOR:

BLGO. RAMÓN ZAMBRANO, Mg.

CALCETA, JUNIO 2016

DERECHOS DE AUTORÍA

Darío Fabián Vera Cedeño, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o certificación profesional, y que he consultado las referencias bibliográficas que incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedo los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido por la Ley de la Propiedad Intelectual y su reglamento.

.....
Darío Fabián Vera Cedeño

CERTIFICACIÓN DE TUTORÍA

Ramón Zambrano certifica haber tutelado la tesis **COMPOSICIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES AUTÓCTONOS EN UN SUELO CONTAMINADO POR HIDROCARBUROS**, que ha sido desarrollada por Darío Fabián Vera Cedeño, previa a la obtención del título de Ingeniero en Medio Ambiente, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

.....
Blgo. Ramón Zambrano Aveiga, Mg.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos ingenieros del tribunal correspondiente, declaran que han **APROBADO** la tesis **COMPOSICIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES AUTÓCTONOS EN UN SUELO CONTAMINADO POR HIDROCARBUROS**, que ha sido propuesta, desarrollada y sustentada por Darío Fabián Vera Cedeño, previa a la obtención del título de Ingeniero en Medio Ambiente, de acuerdo al REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

.....

Ing. Verónica Espinel Pino, M.Sc

MIEMBRO

.....

Arq. Francisco Solórzano Murillo, M.Sc

MIEMBRO

.....

Ing. Joffre Andrade Candell, M.Sc

PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me da la oportunidad de una educación superior de calidad y en la cual estoy forjando mis conocimientos profesionales día a día;

A mis padres Wasinton Vera y Gina Cedeño por la dedicación, apoyo y esfuerzo dedicados para conseguir esta meta.

A mi esposa Tania Terreros por cada palabra de aliento, por ser incondicional y buscar mi progreso.

A mi hermano Fabricio Vera por el soporte brindado durante las etapas más álgidas del desarrollo de esta investigación.

A mi Tutor Biólogo Ramón Zambrano por brindarme las luces necesarias y guiarme hacia la meta esperada.

A los profesores de la Carrera de Ingeniería Ambiental por la confianza y apoyo en cada paso hacia esta meta.

A los profesores de la Carrera de Turismo por la apertura a la hora de solicitarles su apoyo, y

Al Grupo Químico Marcos por su comprensión y solidaridad con los servicios prestados a mi persona.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi familia en general, en especial, a mi esposa Tania Terreros y a mi hijo Samuel Vera Terreros que son la inspiración necesaria para seguir luchando día a día.

CONTENIDO GENERAL

DERECHOS DE AUTORÍA.....	ii
CERTIFICACIÓN DE TUTORÍAiii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vi
CONTENIDO GENERALvii
CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	2
1.3. OBJETIVOS.....	3
1.4. HIPÓTESIS.....	4
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. MICROORGANISMOS EFICIENTES (EM).....	5
2.1.1. TIPOS DE MICROORGANISMOS QUE CONFORMAN EL COMPLEJO EM .	5
2.2. IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS EFICACES	6
2.3. SUELO	6
2.4. CALIDAD DEL SUELO	7
2.4.1. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL SUELO	7
2.5. CONTAMINACIÓN POR HIDROCARBUROS	9
2.6. BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS.....	10
2.6.1. DESCRIPCIÓN GENERAL	10
2.6.2. CARACTERÍSTICAS	11
2.7. BACTERIAS FOTOTRÓPICAS	12
2.7.1. DESCRIPCIÓN GENERAL	12
2.7.2. FUENTES Y PREVALENCIA	13
2.8. LEVADURAS.....	13
2.9. MOHOS.....	14
2.9.1. CARACTERÍSTICAS	15
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO	16
3.1. MÉTODO.....	16

3.2.	UBICACIÓN.....	16
3.3.	DURACIÓN DEL TRABAJO	17
3.4.	VARIABLES EN ESTUDIO.....	17
3.4.1.	VARIABLE INDEPENDIENTE:.....	17
3.4.2.	VARIABLE DEPENDIENTE:	17
3.5.	PROCEDIMIENTO	17
3.5.1.	FASE UNO. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL SUELO NO CONTAMINADO Y CONTAMINADO	17
3.5.2.	FASE DOS. OBTENCIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES DE SUELOS NO CONTAMINADO Y CONTAMINADO POR HIDROCARBUROS.....	18
3.5.3.	FASE TRES. COMPARACIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES AUTÓCTONOS EN SUELOS NO CONTAMINADO Y CONTAMINADO POR HIDROCARBUROS.....	21
3.6.	TÉCNICAS ESTADÍSTICAS.....	22
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		23
4.1.	DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS SUELOS NO CONTAMINADO Y CONTAMINADO.....	23
4.2.	OBTENCIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES AUTÓCTONOS EN SUELOS NO CONTAMINADO Y CONTAMINADO.....	24
4.3.	COMPARACIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES AUTÓCTONOS EN SUELOS NO CONTAMINADO Y CONTAMINADO.....	26
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		30
5.1.	CONCLUSIONES.....	30
5.2.	RECOMENDACIONES.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....		32
ANEXOS.....		41

CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 3.1.	Materiales para elaborar capturadores y solución madre.	19
Gráfico 4.1.-	Caracterización de los suelos muestreados.	23
Cuadro 4.1.-	t-Student entre las muestras tomadas en los sitios de estudio.	27
Gráfico 4.3.-	Diagrama de cajas de los EMA del suelo contaminado.	29
Gráfico 4.4.-	Diagrama de cajas de los EMA del suelo no contaminado.	29

RESUMEN

El presente estudio busca determinar la influencia de los suelos contaminados por hidrocarburos a la composición de Microorganismos Eficientes Autóctonos (EMA), comparándolos con los EMA de un suelo no contaminado, para ello se realizó una investigación de tipo no experimental correlacional-causal. Es decir, se realiza sin manipular deliberadamente las variables, se observan los fenómenos tal como se dan en su contexto natural, para posteriormente analizarlos. Se determinaron las propiedades físico-químicas del suelo no contaminado y contaminado (textura, pH y TPH), además de obtener EMA de ambos suelos, determinar la presencia de microorganismos en UFC/ml, para realizar una comparación de la composición de EMA en suelos no contaminado y contaminado por hidrocarburos mediante una prueba estadística t-Student y Diagrama de cajas. Las diferencias de las características de ambos tipos de suelos resultaron evidentes, un TPH de 5819,20 mg/Kg para el suelo contaminado y 775,20 mg/Kg para el control, Se obtuvo como resultado, la existencia de diferencias altamente significativas ($P \leq 0,001$) y significativas ($P \leq 0,005$) en la composición de microorganismos de ambos suelos, la presencia de los Mohos y *Lactobacillus* fue casi nula dentro del suelo contaminado. Dado los valores de presencia obtenidos en los dos tipos de suelo, se pudo conocer la clara presencia de los *Bacillus* y una posible aptitud de las Levaduras a existir en suelos contaminados por hidrocarburos, además, de su potencial como degradadores, que podría ser estudiado, para obtener poblaciones de microorganismos nativos degradadores de hidrocarburos.

Palabras clave: Microorganismos eficientes autóctonos EMA, hidrocarburos, composición, TPH.

ABSTRACT

This study determines the influence of contaminated soil by hydrocarbons to the composition of Native Efficient Microorganisms (EMN), compared with the EMN of an uncontaminated soil, to do this was performed correlational research-causal non experimental type. The phenomenon was observed as it occurs in natural conditions and was further analyzed. Studied variables were not manipulated. The physic-chemical conditions of the soil in natural and contaminated state (texture, pH and TPH) were determined, samples of EMN from uncontaminated and contaminated state soil were collected and studied, determining CFU/ml from both samples and correlating the survival of native microorganisms in both conditions based using a T-Student statistic test and box plot. The differences of the characteristics of both types of soils were evident, one TPH 5819.20 mg / kg for contaminated soil and 775.20 mg / kg for control. Was obtained as a result, the existence of significant highly differences ($P \leq 0.001$) and significant ($P \leq 0.005$) in the composition of microorganisms of both soils, the survival rate of *Modis* and *Lactobacillus* was lower than the rest within the contaminated soil. The survival values obtained in the two types of soil, could know the clear survival of *Bacillus* and a possible ability of Yeasts to exist in contaminated soils further hydrocarbons potential as degraders, which could be studied soils, for populations of native hydrocarbon degrading microorganisms.

Keywords: Efficient Microorganisms Native EMN, hydrocarbons, composition, TPH.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El incorrecto manejo de residuos y materiales hidrocarburíferos que son de carácter peligroso ha generado una problemática a nivel mundial, un problema de contaminación en la atmósfera, agua y el suelo (Benavides *et al.*, 2006). De acuerdo a lo expresado por los autores Vasudevan y Rajaram (2001) citados por Zamora *et al.* (2012), los derrames de hidrocarburos en el suelo afectan su estructura y bioprocesos ya que generan efectos directos sobre la biota por los compuestos de origen químicos en el petróleo. Pardo *et al.* (2004) puntualiza los efectos sobre los suelos contaminados por hidrocarburos en la inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal, cambios en la dinámica poblacional de la fauna y sobre todo de la biota microbiana.

Los hidrocarburos en el suelo causan problemas ecotoxicológicos; los daños para las plantas y los microorganismos se originan por el potencial tóxico, carcinogénico y mutagénico de los hidrocarburos (Pothuluri y Cerniglia, 1994 citado por Rivera *et al.*, 2005). Hay un problema muy sensible para el hombre y los seres vivos en general, la bioacumulación, que significa el aumento en la concentración del producto químico en un organismo vivo, específicamente en las plantas, que representan un riesgo potencial para la salud del hombre al consumirlas (Angelova *et al.*, 2004 citado por Prieto *et al.*, 2009).

Por otra parte como manifiesta el autor Mohamad (2004) citado por Medina *et al.* (2014), cada microorganismo tiene una capacidad limitada para degradar las diferentes moléculas de los hidrocarburos, por lo que para su mineralización requiere acción de más de una especie de microorganismos, proceso que se ve minimizado por altos grados de contaminación. Esta problemática se agudiza por la falta de preparación en el manejo de hidrocarburos.

Con tales antecedentes, se establece la siguiente interrogante: ¿Cómo influyen los suelos contaminados por hidrocarburos a la composición de microorganismos eficientes?

1.2. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años han existido importantes avances en el área ambiental (Martínez y García, 2012), ya que, los microorganismos suelen ser muy resistentes, según los autores Schimel *et al.* (2007) citados por Ciadamidaro (2013), los microorganismos pueden adaptarse de manera rápida en caso de estrés ambiental. Por ejemplo, en caso de contaminación por hidrocarburos, los microorganismos podrían adaptarse y utilizar los hidrocarburos como fuente de energía y alimento. La sostenibilidad en el suelo se da en función de su fertilidad, y como lo manifiesta Ferrera y Alarcón (2001) uno de los parámetros fundamentales es el biológico; es decir microorganismos que conforman la micro flora, micro fauna además de la meso y macro fauna. Diferentes técnicas de observación de secciones ultrafinas de suelo, demostraron que los microorganismos edáficos están distribuidos de manera altamente estructurada, y que esto es importante para la funcionalidad del suelo (García, 2013). Se podría asegurar entonces que existe un equilibrio microbiano y que éste se puede romper a causa de alguna contaminación.

Pérez *et al.* (2008), aseguran que la alternativa de solución frente a la remediación química, es la biorremediación, tecnología que aprovecha la capacidad metabólica de los microorganismos (levaduras, bacterias, hongos, microalgas), plantas y sistemas biológicos (enzimas) para degradar, biotransformar o hacer ambas cosas a estos contaminantes. En otras palabras, permite estimular la degradación natural que provocan los microorganismos en ecosistemas contaminados.

En el artículo 409 de la Constitución de la República del Ecuador (2008), se manifiesta que, es de interés público y prioridad nacional la conservación del suelo, en especial su capa fértil. Según los autores Corona e Iturbe (2005), los microorganismos son esenciales para cambiar la química del suelo, estos cambios pueden disminuir directa o indirectamente las concentraciones de los contaminantes, convirtiendo a la biodegradación en uno de los procesos principales que propician la atenuación natural en el suelo. La presencia de microorganismos autóctonos es realmente necesaria a la hora de pensar en la

biorremediación como primera alternativa en los problemas de contaminación por hidrocarburos.

Estudios como el de Campo *et al.* (2014), indican que los EM autóctonos o nativos tienden a dar mejores resultados que los EM comerciales. Al ser diferentes las condiciones de Manabí, es necesario conocer la composición de los microorganismos eficientes autóctonos para realizar investigaciones posteriores y aislar aquellos que presenten un mayor nivel de tolerancia a los hidrocarburos para comprobar su capacidad de degradación.

Pérez *et al.* (2008) argumentan que el estudio de la diversidad microbiana y de la dinámica de sus poblaciones en consorcios biodegradadores, está creciendo notablemente en el área de la ecología microbiana, lo cual ha permitido profundizar en el conocimiento acerca de la composición de las comunidades presentes en suelos contaminados, así como su evolución durante los procesos de biodegradación, para determinar cuáles son los microorganismos capaces de adaptarse y de explorar los hábitats contaminados. Es por ello que con el presente estudio se pretende generar información a nivel local acerca de la composición de microorganismos en un suelo que ha sido contaminado por hidrocarburos

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la influencia de los suelos contaminados por hidrocarburos a la composición de microorganismos eficientes.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las propiedades físico-químicas de los suelos no contaminado y contaminado
- Obtener EMA en suelos no contaminado y contaminado por hidrocarburos.
- Comparar los EMA de suelos no contaminado y contaminado por hidrocarburos.

1.4. HIPÓTESIS

La contaminación del suelo por hidrocarburos influye significativamente a la composición de los microorganismos eficientes.

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1. MICROORGANISMOS EFICIENTES (EM)

El EM es un producto microbiano multipropósito, el cual contiene varios tipos de organismos vivos (Ramírez, 2006). Los microorganismos eficientes son una cultura mixta de microorganismos benéficos que pueden aplicarse como inoculante para incrementar la diversidad microbiana de los suelos (Arias, 2010), y son capturados de sistemas naturales, los cuales no han sido sometidos a modificación genética y se relacionan de forma simbiótica coexistiendo entre sí, lo cual ha generado efectos positivos para un ambiente en equilibrio (Campo *et al.*, 2014). Estos microorganismos eficientes cuando entran en contacto con materia orgánica secretan sustancias beneficiosas como vitaminas, ácidos orgánicos, minerales quelatados y fundamentalmente sustancias antioxidantes (Toalombo, 2012). Y las investigaciones han demostrado que la inoculación del suelo con microorganismos eficientes puede mejorar la calidad y condición del suelo (Ayala, 2011).

2.1.1. TIPOS DE MICROORGANISMOS QUE CONFORMAN EL COMPLEJO EM

Toalombo (2012), indica que los Microorganismos Eficientes son una combinación de microorganismos beneficiosos de cuatro géneros principales: Bacterias fototróficas, levaduras, bacterias productoras de ácido láctico y hongos de fermentación o también llamados mohos.

Las bacterias fotosintéticas son microorganismos autosuficientes e independientes. Ellas sintetizan las sustancias útiles producidas por la secreción de las raíces, materia orgánica y/o gases perjudiciales (como el Sulfuro de Hidrógeno) utilizando la luz solar y el calor del suelo como fuentes de energía. (Higa y Parr, 2010). Mientras que las levaduras sintetizan sustancias antimicrobiales y otras sustancias útiles para el crecimiento de las plantas, a partir de aminoácidos y azúcares secretados por las bacterias fotosintéticas, la materia orgánica y las raíces de las plantas (APROLAB, 2007).

Por otro lado las bacterias ácido lácticas producen ácido láctico a partir de azúcares y otros carbohidratos desarrollados por bacterias fotosintéticas y levaduras (APNAN, 2013). Y finalmente los hongos de fermentación actúan descomponiendo la materia orgánica rápidamente para producir alcohol, ésteres y sustancias antimicrobianas. Esto es lo que produce la desodorización y previene la aparición de insectos perjudiciales (Ramírez, 2006).

2.2. IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS EFICACES

Los microorganismos eficientes, como inoculante microbiano, reestablece el equilibrio microbiológico del suelo, mejorando sus condiciones físico-químicas, incrementando la producción de los cultivos y su protección; además conserva los recursos naturales, generando una agricultura sostenible (APROLAB, 2007). Según (Montaño *et al.*, 2010) se reconoce que los microorganismos son más diversos y versátiles que los macroorganismos debido a su historia evolutiva y a su rápida capacidad para adaptarse a los cambios ambientales. Entre los beneficios del uso de microorganismos en la agricultura están su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, la descomposición de residuos orgánicos, la desintoxicación con plaguicidas, la supresión de enfermedades en las plantas, el aporte de nutrientes al suelo y la producción de compuestos bioactivos como vitaminas y hormonas que estimulan el crecimiento de las plantas (Martínez, 2002 citado por Elein *et al.*, 2005).

Esta mezcla biológica de microorganismos ha demostrado tener un poder regenerativo sobre la materia orgánica que puede ser empleada para múltiples aplicaciones (Ramírez, 2006).

2.3. SUELO

El suelo es un recurso indispensable para la vida que permite el desarrollo de las plantas, los animales y el hombre. En los últimos años se han propuesto nuevas definiciones que integran las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos, así como su capacidad de ser sostenibles, producir alimentos sanos y mitigar la polución medioambiental (García, 2011). Es decir que el suelo puede considerarse como un sistema natural desarrollado a partir de una

mezcla de minerales y restos orgánicos, bajo la influencia del clima y del medio biológico. Está formado por material mineral: arena, limo y arcilla (Ruda, 2004). Es considerado también como un cuerpo natural involucrado en interacciones dinámicas con la atmósfera y con los estratos que están debajo de él, que influye en el clima y en el ciclo hidrológico del planeta, y que sirve como medio de crecimiento para diversos organismos. Además, el suelo juega un papel ambiental de suma importancia, ya que puede considerarse como un reactor biofísicoquímico en donde se descompone material de desecho que es reciclado dentro de él (Hillel, 1998 citado por INECC, 2004)

2.4. CALIDAD DEL SUELO

La calidad y la salud del suelo son conceptos equivalentes, no siempre considerados sinónimos (Doran y Parkin, 1994 citado por Bautista *et al.*, 2004). La calidad del suelo se considera como una medida de su capacidad para funcionar adecuadamente en relación con un uso específico (Gregorich *et al.*, 1994). El Comité para la Salud del Suelo de la Soil Science Society of America la define como la capacidad del suelo para funcionar dentro de los límites de un ecosistema natural o manejado, sostener la productividad de las plantas y los animales, mantener o mejorar la calidad del aire y del agua, y sostener la salud humana y el hábitat (García *et al.*, 2012), para ellos es necesario contar con variables que puedan servir para evaluar la condición del suelo. Así surgen los indicadores, pues las variables representan una condición y conllevan información sobre los cambios o tendencias (Dumanski *et al.*, 1998).

Los indicadores de la calidad de suelo se conciben como una herramienta de medición que debe ofrecer información sobre las propiedades, los procesos y las características. Estos se miden para dar seguimiento a los efectos del manejo sobre el funcionamiento del suelo en un periodo dado (Astier *et al.*, 2002).

2.4.1. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL SUELO

Los suelos se consideran como sistemas biogeoquímicos multicomponentes y abiertos, esta sometidos a flujos de masa y energía con la atmosfera, la

biosfera y la hidrosfera, su composición es altamente variable y también cambia con el tiempo (TULSMA, 2003). Una propiedad física, química o biológica del suelo es aquella que caracteriza al suelo; por ejemplo, la composición química y la estructura física del suelo están determinadas por el tipo de material geológico del que se origina, por la cubierta vegetal, (Sposito, 1989 citado en Volke *et al.*, 2005).

Las propiedades más importantes de las que engloban estos grupos son el tamaño de la partícula, la porosidad, la humedad, estado de aireación, composición química, fracción de arcilla, capacidad de intercambio de cationes y fracción orgánica (Hernández *et al.*, 2012). Se dice que un suelo tiene una buena textura cuando la proporción de los elementos que lo constituyen le dan la posibilidad de ser un soporte capaz de favorecer la fijación del sistema radicular de las plantas y su nutrición. (Rucks *et al.*, 2004).y que el espacio poroso de un suelo es la parte del mismo que en su estado natural está ocupado por aire y/o agua. El volumen de este espacio poroso depende mucho de la disposición de las partículas sólidas (Flores Y Alcalá, 2010).

De acuerdo a (Aguilera, 1989 citado por Huerta, 2010). La densidad aparente está relacionada con el peso específico de las partículas minerales y las partículas orgánicas así como por la porosidad de los suelos y la densidad real está asociada únicamente al tamaño de las partículas sólidas del suelo; es decir, a su textura. Si las partículas son pequeñas ocupan menos espacio que si son grandes, y viceversa. (Gisbert, 2012) pero sin duda una de las características del suelo más importantes es su reacción, ésta ha sido debidamente reconocida debido a que los microorganismos y plantas superiores responden notablemente tanto a su medio químico, como a la reacción del suelo y los factores asociados con ella. Tres condiciones son posibles: acidez, neutralidad, y alcalinidad (Buckman y Brady, 1966 citado por Huerta, 2010). En cambio la materia orgánica del suelo (MO) es considerada un indicador de salud del suelo y su efecto positivo sobre la sostenibilidad del sistema productivo ha sido ampliamente documentado. Para un determinado ambiente, los niveles de MO más elevados se encuentran en pastizales naturales, y cuando estos sistemas son cultivados, se produce una rápida

caída de la MO seguida por una declinación más lenta hasta un nuevo estado estable. El nivel de MO en dicho estado va a depender del clima, suelo y del manejo del mismo (labranzas, rotaciones, secuencias de cultivos agrícolas, fertilización). La intensificación de la actividad agrícola y la falta de rotaciones con pasturas han producido un deterioro de los niveles de MO, los que en algunos casos, dependiendo del tipo de suelo y textura, presentan sólo el 50% de su nivel original (Sainz *et al.*, 2011).

2.5. CONTAMINACIÓN POR HIDROCARBUROS

La contaminación del suelo y agua ha venido en aumento como resultado de la explotación, refinación, distribución y almacenamiento de petróleo crudo y sus derivados. (Ferrera *et al.*, 2006)

Los hidrocarburos estipulan una actividad económica de primera importancia a nivel mundial ya que son los principales combustibles fósiles, además sirven de materia prima para todo tipo de plásticos, ceras y lubricantes. Pero son estas formas de elevado valor económico (petróleo y derivados) las responsables de graves problemas de contaminación en el medio natural. (Alonzo, 2012)

El problema de los suelos contaminados con hidrocarburos radica en que hasta hace pocos años no existía conciencia del grado de la dificultad y el costo que representa la remediación de los suelos. (Saval, 1995 citado por Ortíz *et al.*, 2003). La contaminación de suelos por hidrocarburos ha cobrado importancia tal que, como consecuencia, se requiere remediarlos a niveles aceptables (Martínez *et al.*, 2001). Por ello, se ha planteado la posibilidad de buscar alternativas ambientales correctas, simples y económicas. (Riojas *et al.*, 2010)

Una mejor alternativa de solución es la biorremediación, tecnología emergente que aprovecha la capacidad metabólica de los microorganismos (Pérez *et al.*, 2008); elementos biológicos que contribuyen a la oxidación, degradación, transformación y completa mineralización de estos contaminantes (Ferrera *et al.*, 2006). Debido a ello, el estudio de la diversidad microbiana y de la dinámica de sus poblaciones en consorcios biodegradadores, está creciendo notablemente en el área de la ecología microbiana (Pérez *et al.*, 2008). Por

ejemplo, en suelos se presenta el proceso de atenuación natural, capacidad de los suelos para degradar cantidades de sustancias orgánicas; fundamentalmente ligadas a procesos metabólicos en microorganismos (Pardo *et al.*, 2004)

Los microorganismos eficientes pueden utilizarse como inoculantes del suelo para reconstruir su equilibrio biológico, mejorar la asimilación de nutrientes para que estén de esta manera disponibles, suprimir microorganismos patógenos indeseables por “exclusión competitiva o dominación absoluta” (Peñañiel, 2005)

2.6. BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS

2.6.1. DESCRIPCIÓN GENERAL

Las bacterias lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representadas por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común (Ramírez *et al.*, 2007); representan un alto potencial biotecnológico, dada su presencia en diversos procesos fermentativos (Rondón *et al.*, 2009).

Lactobacillus sp. es una de los géneros probióticos más importantes y se encuentra casi en cualquier nicho, o en cualquier lugar donde se encuentren carbohidratos disponibles, se conocen más de 140 especies diferentes que incluyen bacterias Gram positivas, sin movilidad, catalasa negativas, no esporuladas y que pueden desarrollarse en ambientes microaerófilicos o anaeróbicos, pueden presentar formas espiraladas o cocobacilares bajo ciertas condiciones (4-5,6) también hay reportes y estudios que demuestran que hay variedades de levaduras que presentan actividades similares a las de las BAL (Ramírez, 2010). El grupo de los BAL está comprendido por aproximadamente 20 géneros. Siendo los siguientes 12 los más representativos (Mora y García, 2007).

- *Carnobacterium*
- *Enterococcus*
- *Lactococcus*
- *Lactobacillus*
- *Lactosphaera*
- *Leuconostoc*
- *Oenococcus*
- *Pediococcus*

- *Streptococcus*
- *Tetragenoccus*
- *Vagococcus*
- *Weissella*

Dicha clasificación corresponde a similitudes en las características morfológicas, metabólicas, fisiológicas, crecimiento a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido, capacidad de crecer a elevadas concentraciones de sales y en la tolerancia ácido-base (Amarocho, 2011).

2.6.2. CARACTERÍSTICAS

En general las BAL son cocos y bacilos de longitud variable y de un grosor de 0,5 – 0,8 μm (Parra, 2010), Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y bencidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Ramírez *et al.*, 2007).

Generan ambientes poco favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos, debido a su marcada capacidad antagonista (Rondón *et al.*, 2009).

Se ha comprobado que algunas cepas de bacterias lácticas, entre ellas las del género *Lactobacillus*, son beneficiosas para la salud tanto humana como animal (Rondón *et al.*, 2009).

Las BAL son ácidos tolerantes pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3,2; otras a valores tan altos como 9,6; y la mayoría crece a pH entre 4 y 4,5; permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no aguantarían la aumentada actividad producida por ácidos orgánicos (Ramírez *et al.*, 2007). Pueden ser ampliamente usadas como probióticos por sus características de resistencia a pH bajo, altas concentraciones de sales biliares y reducción del colesterol entre otros (Ramírez, 2010).

2.7. BACTERIAS FOTOTRÓPICAS

2.7.1. DESCRIPCIÓN GENERAL

Son bacterias autótrofas que sintetizan sustancias útiles a partir de secreciones de raíces, materia orgánica y gases dañinos, usando la luz solar y el calor del suelo como fuentes de energía. Las sustancias sintetizadas comprenden aminoácidos, ácidos nucleicos, sustancias bioactivas y azúcares, promoviendo el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los metabolitos son absorbidos directamente por ellas, y actúan como sustrato para incrementar la población de otros Microorganismos Eficaces (Arias, 2010). Además de descomponer los malos olores que producen el Hidrógeno, Sulfatos y Amoníacos (Higa, 2009).

Según el blog Microorganismos Eficientes (2013) las bacterias fototrópicas son microorganismos autosuficientes que aprovechan la luz solar y el calor del suelo como fuentes de energía para sintetizar las sustancias beneficiosas (ácidos nucleicos, aminoácidos, sustancias bioactivas y azúcares) generadas por la segregación de las raíces, materia orgánica o gases nocivos (como el sulfuro de hidrógeno).

Los microorganismos del género *Bacillus* son bacilos de gran tamaño (4-10 µm), Gram positivos, aerobios estrictos o anaerobios facultativos encapsulados. Una característica importante es que forman esporas extraordinariamente resistentes a condiciones desfavorables. Las especies del género *Bacillus* se clasifican en los subgrupos *B. polymyxa*, *B. subtilis* (que incluye a *B. cereus* y *B. licheniformis*), *B. brevis* y *B. anthracis* (Bartam *et al.*, 2003).

Características generales del género *Bacillus*: Gram positivos, rectos, delgados, formadores de endosporas. Poseen cápsula polisacáridica o polipeptídica. Aerobio o anaerobio facultativos. Productores de enzimas hidrolíticas. Importante desde el punto de vista industrial: producción de enzimas y antibióticos. Incluye especies patógenas para el hombre y animales.

Se encuentran en suelos, agua y aire (las endosporas) y tienen gran importancia ecológica: degradación de la materia orgánica en aerobiosis (Martín, 2014?).

2.7.2. FUENTES Y PREVALENCIA

La presencia de *Bacillus spp.* es frecuente en una gran variedad de ambientes naturales, como el agua y el suelo. Forman parte de las bacterias detectadas mediante RHP, fácilmente detectables en la mayoría de las aguas de consumo (Bartam *et al.*, 2003).

2.8. LEVADURAS

Las levaduras son usadas para elaborar pan, cerveza, vino, etc. Son hongos microscópicos unicelulares capaces de descomponer materias orgánicas a través de la fermentación, especialmente hidratos de carbono o azúcares, generando diferentes sustancias. Las levaduras sintetizan y utilizan las sustancias antimicrobianas que intervienen en el crecimiento de las plantas, a partir de los azúcares y aminoácidos producidos por las bacterias fotosintéticas, así como las de la materia orgánica y de las raíces de las plantas. Las levaduras producen sustancias bioactivas, como las enzimas y hormonas que aumentan la actividad celular y la cantidad de raíces. Además, segregan sustratos que son útiles a determinados microorganismos efectivos, como los actinomicetes y las bacterias productoras del ácido láctico (Blog de Microorganismos Eficientes, 2013).

Estos microorganismos (*Saccharomyces spp*) sintetizan sustancias antimicrobiales y útiles para el crecimiento de las plantas a partir de aminoácidos y azúcares secretados por bacterias fototróficas, materia orgánica y raíces de las plantas (Arias, 2010).

Las sustancias bioactivas, como hormonas y enzimas, producidas por las levaduras, promueven la división celular activa. Sus secreciones son sustratos útiles para Microorganismos Eficaces como bacterias ácido lácticas y actinomicetos. El concepto de la inoculación de suelos y plantas con

microorganismos benéficos para crear un ambiente microbiano más favorable para el crecimiento de las plantas ha sido motivo de discusión durante décadas por parte de los científicos dedicados a la agricultura (Fundases, sf citado por Arias, 2010).

El principio biológico que determina la actuación de este consorcio de bacterias se basa, entre otras propiedades, en su carácter antioxidante. Además, cuando estos microorganismos entran en contacto con la materia orgánica, secretan sustancias benéficas como vitaminas, ácidos orgánicos y minerales. Así mismo, prosperan por exclusión competitiva, tanto en nichos contaminados como en descomposición, para luego morir cuando las condiciones son limpias, por lo cual no existe riesgo de contaminación secundaria (Arias, 2010).

Según Higa (2009), estos microorganismos sintetizan sustancias antimicrobiales. Las sustancias bioactivas, como hormonas y enzimas, producidas por las levaduras, promueven la división celular activa. Sus secreciones son sustratos útiles para otros Microorganismos Eficaces como las Bacterias Acidolácticas.

2.9. MOHOS

El término moho se suele aplicar para designar a ciertos hongos filamentosos multicelulares cuyo crecimiento en la superficie de los alimentos se suele reconocer fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso, a veces pigmentado. Generalmente todo alimento enmohecido se considera no apto para el consumo. La identificación y clasificación de los mohos se basa en observaciones macroscópicas y microscópicas (Camacho *et al.*, 2009).

Según para Pascual *et al.* (2000) se da comúnmente el nombre de moho a ciertos hongos multicelulares filamentosos, dotados de un micelio verdadero, microscópicos, y cuyo crecimiento en los alimentos se conoce fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso.

Para el blog Microorganismos Eficientes (2013) los hongos de fermentación, como el *Aspergillus* y la *Penicillium*, son capaces de descomponer rápidamente

la materia orgánica, produciendo esteroides, alcohol y sustancias antimicrobianas. Este proceso genera la desodorización y evita la aparición de gusanos e insectos nocivos.

El moho es un hongo que se encuentra tanto al aire libre como en interiores. Nadie sabe cuántas especies de hongos existen, pero se calcula que puede haber desde decenas de miles hasta quizá trescientas mil o más. El moho crece mejor en condiciones cálidas, mojadas y húmedas, y se propaga y reproduce mediante esporas. Las esporas del moho pueden sobrevivir en condiciones ambientales, como la sequedad, que no favorecen el crecimiento normal del moho (CDC, 2003).

2.9.1. CARACTERÍSTICAS

Filamentosos (Mohos): talo pluricelular, filamentos formados por cadenas de células, hay una especialización celular ya que hay encargadas de absorber nutrientes, formar la hifa, crear los cuerpos fructíferos y las conidias o esporas. Presentan reproducción asexual por medio de las conidias y fragmentos de micelio, y la reproducción sexual puede presentar variedades entre especies. El tamaño es difícil de determinar para individuos, pero el ancho de las hifas puede ser de 10 a 15 μ m de ancho hasta décimas de milímetro de alto, las conidias pueden medir entre 5 y 15 μ m de diámetro y las colonias alcanzar varios centímetros de superficie (Bonilla, 2015).

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. MÉTODO

El estudio se realizó como investigación de tipo no experimental correlacional-causal. Es un tipo de investigación que se realiza sin manipular deliberadamente las variables, se observan los fenómenos tal como se dan en su contexto natural, para posteriormente analizarlos (Hernández *et al.*, 2010). En el presente estudio no se manipuló la variable independiente, porque ésta, ya había sucedido.

3.2. UBICACIÓN

La ubicación de la captura de los microorganismos fue en la Lavadora y Lubricadora Rápidos & Brillosos en las coordenadas S0°50'63,8" O80°10'32,1" y en el Cañaveral de la ESPAM MFL, ubicado en la parte posterior de la Carrera de Ingeniería Ambiental coordenadas S0°49'47,29" O80°11'10,73". Esta investigación se realizó específicamente en las instalaciones de la ESPAM MFL sitio El Limón perteneciente a la ciudad de Calceta - cantón Bolívar - provincia de Manabí.

Los linderos del Campus Politécnico son:

Norte: Sitio La Cañita. Sur: Sitio Figueroa.

Este: Sitio el Limón. Oeste: Sitio la Pastora.

Coordenadas Geográficas:

Latitud: S 1° 0' / S 0° 50' y Longitud: W 80° 15' / W 80° 0'

Coordenadas Planas UTM:

Norte: 9889450 / 9907870 y Este: 583440 / 611270

Código Internacional: 3591-I

3.3. DURACIÓN DEL TRABAJO

La presente investigación tuvo una duración de nueve meses a partir del inicio diseño de la investigación. Se inició a finales de noviembre de 2014 hasta las primeras semanas de agosto de 2015.

3.4. VARIABLES EN ESTUDIO

3.4.1. VARIABLE INDEPENDIENTE:

Tipos de suelos.

3.4.2. VARIABLE DEPENDIENTE:

Composición de los Microorganismos Eficientes Autóctonos.

3.5. PROCEDIMIENTO

3.5.1. FASE UNO. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL SUELO NO CONTAMINADO Y CONTAMINADO

Actividad 1.1. Caracterización física y química de los suelos

En la toma de muestras de suelo, se usó como referencia el Artículo 4.5.1.1 del Anexo 2, Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria Medio Ambiental (2003), que indica que el número de alícuotas de suelo no deberá ser inferior a 16 por hectárea, de las cuales 8 serán tomadas en superficie y 8 a 0,5 m de profundidad en los mismos puntos de muestreo, debiendo ser el peso de cada espécimen no inferior a 0,5 kg. Las alícuotas serán mezcladas y homogenizadas para obtener una **muestra compuesta** representativa del suelo, la cual tendrá un peso de entre 0,5 y 1,0 kg, se siguió este procedimiento, se determinaron las características físicas como textura y pH, se enviaron 2 muestras compuestas (una por cada tipo de suelo) para el análisis químico de TPH (Ver Anexo 1).

3.5.2. FASE DOS. OBTENCIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES DE SUELOS NO CONTAMINADO Y CONTAMINADO POR HIDROCARBUROS.

Para obtener los Microorganismos Eficientes Autóctonos se aplicó el protocolo artesanal para la captura de los mismos elaborada por el Dr. Teruo Higa (Enríquez y Viera, 2010), como se describe en las actividades 2.1 a 2.5:

Actividad 2.1. Elección de los sitios donde realizar las capturas.

Se utilizó como sitios de captura de microorganismos la Lavadora y Lubricadora Rápidos & Brillosos y el Cañaveral de la ESPAM MFL, el primero por estar dentro de un ecosistema contaminado con cercanía al río y el segundo porque es un ecosistema alterado con cercanía al río en proceso de recuperación, donde los microorganismos están haciendo su parte en esta recuperación.

Actividad 2.2. Recolección de los materiales para capturar microorganismos autóctonos.

Para llevar a cabo la captura de los microorganismos eficientes se fabricaron 30 capturadores. Para cada capturador se utilizó: 1 recipiente de plástico (tarrina), 1 pedazo de tela nylon (media de mujer), 1 liga, 114 gramos de arroz cocinado con sal (sin manteca), 2 cucharadas de melaza, 2 cucharadas de harina de pescado. La cantidad de capturadores era necesaria para garantizar una elevada diversidad de microorganismos autóctonos.

Elaboración de capturadores	
Material	Cantidad
Recipiente plástico (tarrina)	60 U
Pedazo de tela nylon (media de mujer)	25 U
Arroz cocinado con sal (sin manteca)	6840 g
Melaza	600 ml
Harina de pescado	800 g

Continúa en la siguiente página

ELABORACIÓN Y OBTENCIÓN DE SOLUCIÓN MADRE	
MATERIAL	CANTIDAD
Agua limpia	18 L
Melaza	6 L
Tanque	2 U
Manguera	6 m

Cuadro 3.1. Materiales para elaborar capturadores y solución madre.

Actividad 2.3. Preparación de los capturadores.

Se colocaron 114 gramos de arroz cocinado con sal, sin manteca por tarrina. Además, se agregaron 2 cucharadas de melaza y 2 cucharadas de harina de pescado. Se tapó la boca de cada recipiente con un pedazo de tela nylon, asegurándolo bien con una liga, luego de completado se cavaron hoyos del tamaño de las tarrinas para sembrarlas a nivel del suelo los alrededores del lugar escogido y se las cubrió con materia orgánica (ver Anexos 2 y 3).

Actividad 2.4. Cosecha de los microorganismos.

Después de 3 semanas se desenterraron las tarrinas y se obtuvo el arroz impregnado de microorganismos (ver Anexo 4). Se mezcló en un tanque el contenido de todas las tarrinas cosechadas.

Actividad 2.5. Obtención de solución madre.

Agregando 9 litros de agua limpia cocinada pero fresca a la cosecha de arroz con microorganismos y 3 litros de melaza; se procedió a batir con fuerza la mezcla por el espacio de 5 a 10 minutos (ver Anexo 5). Ésta fermentó durante 30 días en dos tanques cerrados herméticamente con purgas para evitar la saturación a causa de los gases producidos por la fermentación.

Transcurridos los 30 días de la fermentación se procedió a filtrar la solución madre para eliminar la parte gruesa de la mezcla (se obtuvo 12 litros de SOLUCIÓN MADRE de Microorganismos Eficientes Autóctonos por tanque como se muestra en Anexo 6).

Actividad 2.6. Activación de los microorganismos autóctonos de ambos tipos de ecosistemas.

Para activar microorganismos presentes en la solución madre se tomó como referencia lo establecido en el Portal Oficial de la Tecnología EM™ en América Latina (2008?), también se utilizó este método para los microorganismos presentes en el EMA, garantizando de esta manera una prueba homogénea.

El proceso de activación es el siguiente:

PARA ACTIVAR: Se usó la proporción de una parte de EMA (5%) para una parte de melaza (5%) de caña o azúcar para dieciocho partes de agua (90%) limpia (sin cloro), así, 1 litro de EMA rindió 20 litros de EMA Activado para aplicación.

Para la activación, se usaron sólo recipientes plásticos limpios y con tapas con cierre hermético para evitar la entrada de aire y una manguera introducida en una botella de agua que permitía la fuga de los gases producto de la fermentación que se estaba realizando dentro. Entonces se procedió a lo siguiente:

- A. Se llenó el recipiente con 9 partes de agua.
- B. Se colocó 1 parte de EMA y 1 parte de melaza.
- C. Los ingredientes se mezclaron bien para disolver la melaza hasta formar una solución homogénea.
- D. Se agregaron las otras 9 partes de agua y se cerró bien el recipiente para evitar la entrada de aire.
- E. Esta mezcla de EMA Activado se mantuvo en un lugar cuya temperatura oscilaba de 25 a 40 °C durante un período de 4 a 7 días para su respectiva fermentación.
- F. El EMA Activado estuvo listo para usar al séptimo día de la confinación.

NOTA: Si el olor del EMA Activado hubiera parecido algo podrido y no estaba agrí dulce y agradable, o si el pH no estaba abajo de 4,0, entonces hubo contaminación y la solución con el producto debía ser desechado, cosa que no ocurrió (ver Anexos 10 y 11).

Actividad 2.7. Toma de muestra para los análisis biológicos.

Se tomaron 10 muestras por tanque a 15 cm de profundidad, cada vez que se tomaba una muestra se revolvía enérgicamente el contenido de los tanques para que las muestras fueran homogéneas de acuerdo con la técnica de muestreo para muestras puntuales de la NTE INEN 2176 (1998).

Actividad 2.8. Determinación de la presencia de microorganismos en las mezclas de ambos tipos de ecosistemas.

Una vez obtenidas las muestras, se transportaron inmediatamente al Laboratorio de Microbiología del Área Agropecuaria de la ESPAM MFL para que realicen los estudios necesarios. Se evaluaron estos parámetros: Recuento de Flora total UFC/ml; Recuento de Mohos UFC/ml; Recuento de Levaduras UFC/ml; Recuento de colonias de *Bacillus sp.* UFC/ml y Recuento de colonias de *Lactobacillus sp.* UFC/ml.

3.5.3. FASE TRES. COMPARACIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES AUTÓCTONOS EN SUELOS NO CONTAMINADO Y CONTAMINADO POR HIDROCARBUROS.

Actividad 3.1. Aplicación de pruebas estadísticas.

Una vez obtenidos los datos se inició la sistematización de los mismos. A los resultados microbiológicos se les realizó la prueba estadística de t-Student en el programa informático especializado SPSS versión 22, tomando como base o factor de comparación los sitios de estudio y con una probabilidad de ocurrencia de fallo del 5% ($\alpha = 0,05$, error de tipo 1). También, con el mismo programa se realizó un Diagrama de cajas para verificar la amplitud intercuartil y la dispersión de las muestras. Una vez obtenido todos los datos se procedió a la redacción del informe escrito o tesis.

3.6. TÉCNICAS ESTADÍSTICAS

Se determinó la concentración preliminar de los análisis de laboratorio y su permutación durante el tiempo de estudio mediante t-Student y Diagrama de cajas.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS SUELOS NO CONTAMINADO Y CONTAMINADO.

Las muestras de suelo tomadas, arrojaron los siguientes datos:

- Muestra 1.- Suelo franco arcilloso, pH 6 y una concentración de TPH de 5819,20 mg/Kg.
- Muestra 2.- Suelo franco arcilloso, pH 5 y una concentración de TPH de 775,20 mg/Kg.

Según la Tabla 6, Anexo 2 del Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador Decreto Ejecutivo 1215 RAOH (2001), los límites permisibles de TPH en suelos para uso industrial es de <4000 mg/Kg y <1000 mg/Kg para ecosistemas sensibles. Comparando los valores se obtiene el siguiente gráfico:

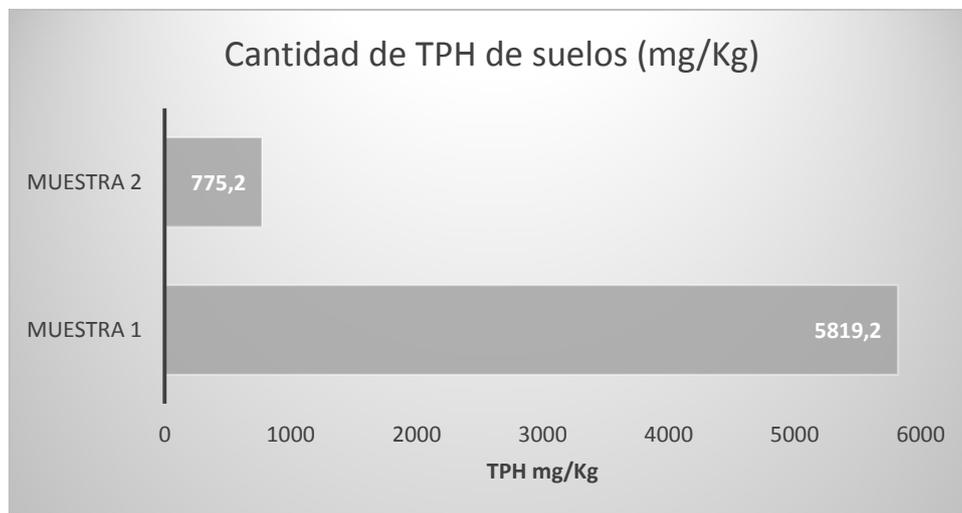


Gráfico 4.1.- Caracterización de los suelos muestreados.

Los datos demuestran que la Muestra 1 está por encima del límite permitido para suelos de uso industrial y que la Muestra 2 está por debajo del límite permitido para suelos sensibles (SNAP), es decir, se encuentra por debajo de los valores considerados como contaminantes. Aunque la diferencia en el TPH

de ambos suelos es altamente significativa, el suelo no contaminado presenta una cantidad de TPH muy elevada, ya que el autor Villacreses (2013) estudió suelos no contaminados de diferente textura, siendo el TPH más alto el del suelo arcilloso 136 mg/Kg, aun así, el TPH es mucho menor al del suelo analizado en este estudio. Seguramente esto se debe a que muy cerca hay una vía interna de la ESPAM MFL y el frecuente transitar de los vehículos esté produciendo esta anomalía.

4.2. OBTENCIÓN DE MICRORGANISMOS EFICIENTES AUTÓCTONOS EN SUELOS NO CONTAMINADO Y CONTAMINADO.

Los capturadores fueron sembrados en el perímetro del área de trabajo de la Lavadora y Lubricadora Rápidos & Brillosos y en la zona interior del Cañaverál. Se recolectaron 36 de 60 capturadores (19 en la lavadora y 17 en el cañaverál), el resto se desechó debido al deterioro presentado, se los mezcló con melaza y agua, luego se lo selló herméticamente en un tanque por cada tipo durante 30 días, se obtuvo 12 litros de solución madre del suelo contaminado y 12 litros de solución madre del suelo no contaminado, en excelente estado organoléptico (ver Anexos 10).

Se realizaron pruebas de laboratorio para demostrar la presencia de microorganismos (ver Anexos 7 y 8). Se verificaron las características organolépticas y presentaba un olor agrídulce agradable y se dio un cambio de color de café-oscuro a café-anaranjado. El pH de la solución se encontraba en 4,0 los EMA del suelo contaminado y 4,0 los EMA del suelo no contaminado como lo indica el Portal Oficial de la Tecnología EMTM en América Latina (2008?) (Ver Anexo 11). Los análisis de recuento de Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/ml) en los laboratorios de la ESPAM MFL a las 10 muestras del EMA de suelo contaminado y a las 10 muestras de EMA de suelo no contaminado (Ver Anexo 12) mostraron que la presencia de general de microorganismos era menor en el suelo contaminado y los datos representados en el siguiente gráfico:

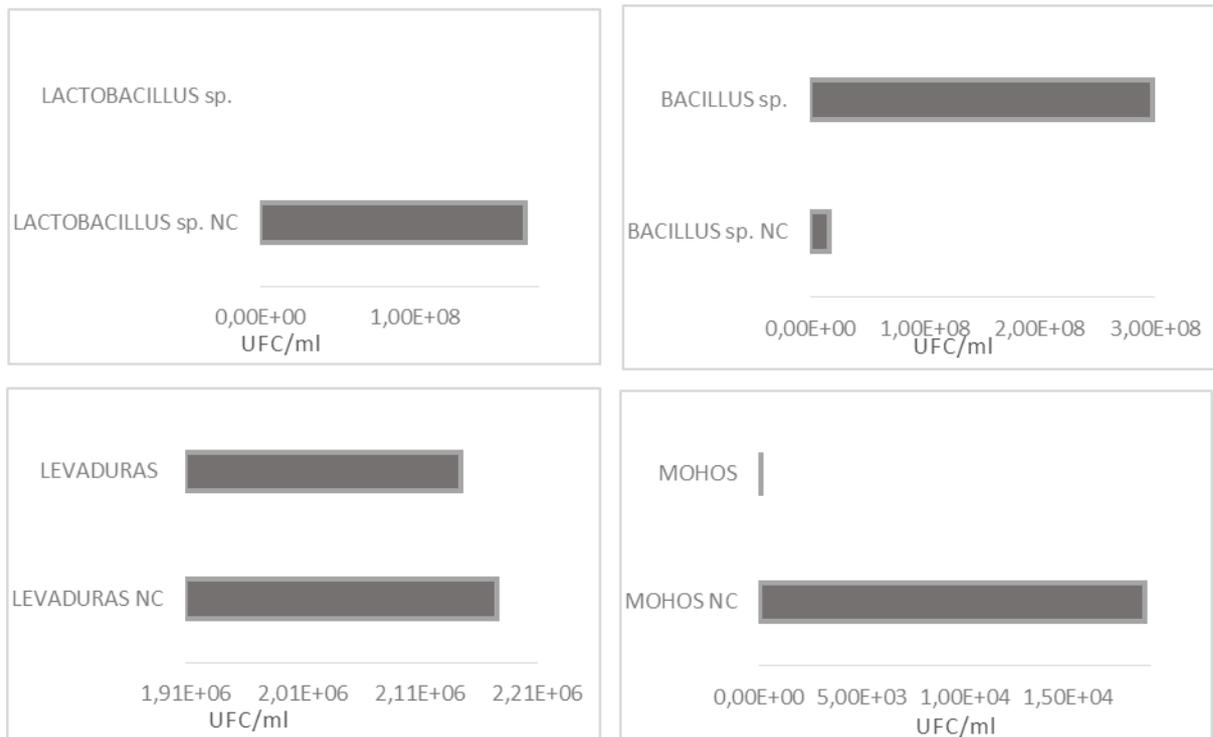


Gráfico 4.2.- Resultados de los análisis a los EMA del suelo no contaminado (NC) y del suelo contaminado.

La presencia de microorganismos en el suelo contaminado va a depender mucho de los nutrientes (Nitrógeno y Fósforo principalmente); un pH medio (4,5 a 7,5), que afecta también, la solubilidad del fósforo y al transporte de metales pesados; la temperatura, que debe mantenerse de 15 a 45 °C, si es muy baja o muy elevada se inhibe su crecimiento y reproducción; humedad, el agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células, un exceso de humedad disminuirá la concentración de oxígeno, y por último, la cantidad de hidrocarburo que limitará los otros factores y la estructura química del hidrocarburo de la que depende si pueden o no los microorganismos degradarlo (Arroyo *et al.*, 2004), estos factores llevaron a la desaparición de los *Lactobacillus* y los Mohos. El autor Parra (2010), indica que *Lactobacillus* producen un conjunto de sustancias antimicrobianas y que hay muchos factores que condicionan el crecimiento y reproducción de los, es muy necesaria la presencia de aminoácidos y vitaminas del grupo B, son quimioorganotróficos y solamente crecen en medios complejos, necesitan de carbohidratos fermentables y alcoholes. Vásquez *et al.* (2010) indica que los *Bacillus* son cepas microbianas con capacidad degradadora de TPH, esto junto

al hecho de no existir la presencia de *Lactobacillus* con efecto bactericida o bacteostático provocó que se pudieran reproducir exponencialmente de manera libre en el suelo contaminado. Liébana (2002), en su libro Microbiología Oral, indica que los hongos obtienen los nutrientes por absorción y tienen un metabolismo quimioheterótrofo, ya que la energía y el carbono proceden de compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos, es decir, al no poder sintetizar los hidrocarburos se inhibió su crecimiento. Acosta *et al.* (2011) y Cruz *et al.* (2015) afirman que existen Levaduras capaces de sobrevivir en presencia de hidrocarburos, lo que explica su presencia en el suelo contaminado.

4.3. COMPARACIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES AUTÓCTONOS EN SUELOS NO CONTAMINADO Y CONTAMINADO.

Una vez realizado el procesamiento estadístico t-Student, se obtuvo como resultado, la existencia de diferencias significativas y altamente significativas entre ambos tratamientos. Flora total, *Lactobacillus* y Mohos ($P \leq 0,001$), mostraron diferencias altamente significativas y *Bacillus* ($P \leq 0,005$), mostraron diferencias significativas. Únicamente, las Levaduras, en los sitios comparados, no mostraron diferencias significativas ($F = 0,974_{(2,1)}$; $P \leq 0,001$).

La sistematización de los datos en el SPSS ocurre de la siguiente manera, de cada uno de los parámetros a analizar (Recuento de Flora total UFC/ml; Recuento de Mohos UFC/ml; Recuento de Levaduras UFC/ml; Recuento de colonias de *Bacillus sp.* UFC/ml y Recuento de colonias de *Lactobacillus sp.* UFC/ml) se toman las diez muestras por tipo de EMA, en primer lugar se suman todos los valores y luego se elevan al cuadrado, como son dos factores de estudio (EMA de suelo contaminado y EMA de suelo limpio) el grado de libertad es 1, luego, por cada tipo de EMA se elevan al cuadrado cada uno de los valores y se suman, la variable es 18 ya que cada tipo tiene 10 muestras y se le quita uno a cada tipo. El total no es más que la suma de los valores anteriores tanto en las sumas cuadráticas como en el grado de libertad. Las medias cuadráticas son la división cada una de las sumas cuadráticas (Entre

grupos y Dentro de grupos) entre sus respectivos grados de libertad. La F es la expresión de la hipótesis nula, que plantea que no hay diferencia significativa entre los grupos comparados, y como las poblaciones muestreadas son normales, F se distribuye según el modelo de probabilidad F de Fisher-Snedecor ($F_{(1;18;0,95)}=4,41$). Comparando estos datos, si la significancia es menor que 0,05 se rechaza la hipótesis nula y se concluye que no todas las medias poblacionales son iguales. Como resumen de evidencia de todo lo anteriormente planteado, se presenta la tabla siguiente:

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
FLORA TOTAL	Entre grupos	20039751132301,820	1	20039751132301,820	5054,870	,000
	Dentro de grupos	7136000001,861	18	3964444444,548		
	Total	2011111132303,680	19			
LACTOBACILLUS	Entre grupos	146204969220001600,000	1	146204969220001600,000	3248,999	,000
	Dentro de grupos	81000000013160,200	18	4500000000731,125		
	Total	147014969220014688,000	19			
BACILLUS	Entre grupos	3959298000000000,000	1	3959298000000000,000	9,273	,007
	Dentro de grupos	7685809000000000,000	18	4269893888888888,000		
	Total	11645107000000000,000	19			
LEVADURAS	Entre grupos	450000000,000	1	450000000,000	,001	,974
	Dentro de grupos	7256000000000,000	18	403111111111,111		
	Total	7256450000000,000	19			
MOHOS	Entre grupos	1738180125,000	1	1738180125,000	233,186	,000
	Dentro de grupos	134173050,000	18	7454058,333		
	Total	1872353175,000	19			

Cuadro 4.1.- t-Student entre las muestras tomadas en los sitios de estudio.

Esta investigación fue realizada para determinar la composición de los EMA en suelos contaminados con hidrocarburos y no se aislaron ni caracterizaron especies. Se reconoce que la presencia de hidrocarburos en el suelo influye significativamente la composición de los EMA, la presencia de bacterias fue casi nula en el caso de los *Lactobacillus*, pero los *Bacillus* mostraron una

presencia elevada en comparación con la presencia en el EMA de suelo no contaminado, esto se debe a que las principales poblaciones degradadoras de hidrocarburos son bacilos (Corona e Iturbe, 2005), esto lo confirman los trabajos de Benavides *et al.* (2006), Pérez *et al.* (2008) y Nápoles *et al.* (2015). Los Mohos tampoco lograron reproducirse de manera adecuada, en cambio, la reproducción de las Levaduras fue normal, tomando como referencia el EMA de suelo no contaminado.

Gran parte de las investigaciones se basan en las bacterias degradadoras de hidrocarburos, como Pérez *et al.* (2008), que aislaron cepas de *Pseudomonas aeruginosa*; también Vallejo *et al.* (2005) estudiaron diferentes cepas de bacterias, siendo la *Stenotrophomonas maltophilia* la especie predominante de dicho estudio. En investigaciones más actuales se le ha dado mayor importancia a las levaduras como microorganismos capaces de sobrevivir en ambientes contaminados con hidrocarburos y su capacidad de degradarlos como el estudio de Acosta *et al.* (2011), que aislaron e identificaron 15 colonias de bacterias y una levadura capaces de crecer en presencia de petróleo, siendo la más frecuente *Pseudomonas aeruginosa* (50,0%), seguida de *Escherichia coli* (31,25%) y *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis* y *Candida albicans* (6,25%); en la actualidad le dan mayor protagonismo a las levaduras, ya sea como productoras de biosurfactantes como en el caso del estudio realizado por Sáenz *et al.* (2013) o como posibles degradadoras de hidrocarburos en el caso de la *Candida tropicalis*, estudiada junto a la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* por parte de Cruz *et al.* (2015).

En los gráficos siguientes se realizaron diagramas de cajas para cada uno de los tipos de microorganismos estudiados agrupados por cada tipo de EMA. En el caso de los microorganismos recolectados del suelo no contaminado (Gráfico 4.4.), la amplitud intercuartil es corta y no se presentan casos atípicos, las densidades poblacionales de cada parámetro coinciden con estudios como el de Valencia y Lizarazo (2009) y el de Monroy *et al.* (2103), indicando que existe un equilibrio microbiano. Por otro lado, los microorganismos del suelo contaminado (Gráfico 4.3.) existen casos atípicos siendo el más relevante el 1×10^9 de los *Bacillus* y éstos mismos muestran una gran amplitud intercuartil.

No existe equilibrio microbiano, pero que sobrevivan *Bacillus* y Levaduras es un fuerte indicador para asegurar que existen poblaciones de microorganismos degradadores de hidrocarburos.

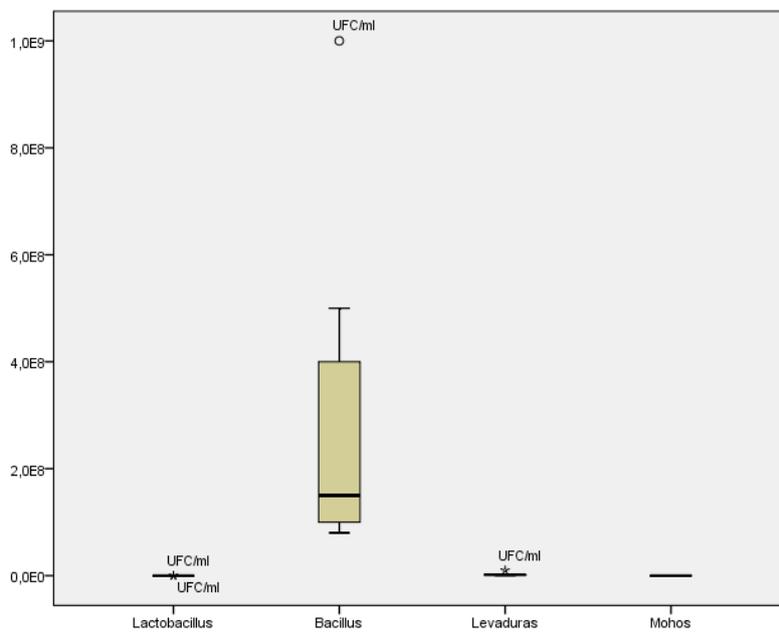


Gráfico 4.3.- Diagrama de cajas de los EMA del suelo contaminado.

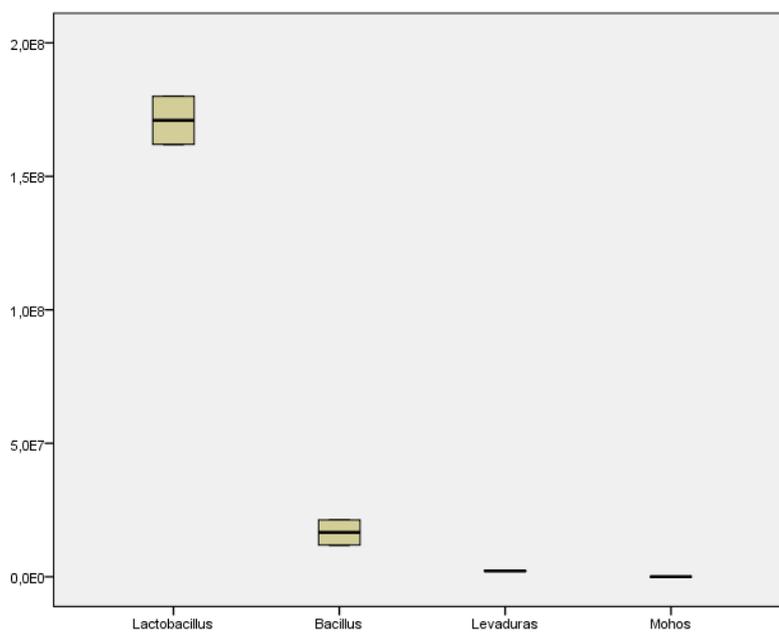


Gráfico 4.4.- Diagrama de cajas de los EMA del suelo no contaminado.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- El suelo de la Lavadora y Lubricadora Rápidos & Brillosos se encuentra en nivel de contaminación muy elevado, 45% por encima del nivel permitido por el Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador.
- Con un 60% de capturadores en buen estado recolectados, los 12 litros de Solución Madre por cada tipo de EMA obtenidos son aceptables, de acuerdo con el protocolo artesanal utilizado. Los resultados de los análisis en los EMA de suelos contaminados mostraron diferencias significativas entre las muestras analizadas, contrario a lo observado en los resultados de los EMA de suelo no contaminado donde las muestras eran uniformes y hubo poca variación en los valores. Los *Lactobacillus* y Mohos se encuentran escasos dentro de las instalaciones de la lavadora porque las condiciones para su crecimiento y reproducción no son las adecuadas.
- La presencia de los *Lactobacillus* y Mohos del suelo contaminado fue un 0%, tomando como referencia los resultados del suelo no contaminado. La cantidad de *Bacillus* presentes en el suelo contaminado supera 10 a 1 la cantidad del suelo no contaminado, indicando que existen potenciales poblaciones de bacterias degradadoras de hidrocarburos. Así mismo la presencia de Levaduras en el suelo contaminado de un 99% en comparación del suelo no contaminado indica que podrían ser degradadoras de hidrocarburos o productoras de surfactantes como se ha visto en varias investigaciones.

5.2. RECOMENDACIONES

- Realizar mayor control, por parte de las autoridades, en los espacios donde se realizan labores que incluyen la manipulación de hidrocarburos ya que la contaminación es muy alta.
- Es menester realizar un estudio a los suelos de la ESPAM MFL para determinar el porqué del elevado TPH.

- Por el potencial de los microorganismos presentes del suelo analizado, se recomienda realizar futuras investigaciones para aislar y caracterizar las especies de bacterias y levaduras para así conocer, si además de sobrevivir en ambientes contaminados por hidrocarburos, son capaces de degradarlos.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, I; Moctezuma, M; Tovar, J; Cárdenas, J. 2011. Aislamiento e Identificación de Bacterias y Levaduras Resistentes a Petróleo. San Luis Potosí, MX. Revista Información Tecnológica. Vol. 22. Núm. 6. p 106.
- Alonzo, R. 2012. Proyecto de recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos. En línea. PE. Consultado 28 abril 2015. Formato PDF. Disponible en: https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2012/hdl_2072_206396/PFC_RaquelAlonsoRiesco.pdf.
- Amorocho, C. 2011. Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra. Tesis. Doctor. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia. ES. p 13.
- APNAN (Red de Agricultura natural de para la Región Asia/Pacifico. Manual de Aplicación.)2013. En línea. EC. Consultado 28 abril 2015. Formato html. Disponible en: <http://www.manualdelombricultura.com/foro/mensajes/24227.html>
- APROLAB (Programa de Apoyo a la Formación Profesional para la Inserción Laboral en el Perú) 2007. Manual para la producción de compost con microorganismos eficaces. En línea. PE. Consultado 28 abril 2015. Formato PDF. Disponible en: http://www.em-la.com/archivos-de-usuario/base_datos/manual_para_elaboracion_de_compost.pdf
- Arias, A. 2010. Microorganismos eficientes y su beneficio para la agricultura y el medio ambiente. CO. Revista Journal de Ciencia e Ingeniería. Vol. 2. Núm. 2. p 42-45
- Arroyo, M; Quesada, J; Quesada, R; Geocisa, J. 2004. Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. Geocisa. División de Protección Ambiental, Guadalajara-México. Consultado, 21 de octubre de 2015. Formato PDF. Disponible en: <http://uniciencia.ambientalex.info/infoCT/Aplsisbiosueaguconhidint.pdf>
- Astier, M; Maass, M; Etchevers, J. 2002. Derivación de indicadores de calidad de suelos en el contexto de la agricultura sustentable. Instituto de Ecología. UNAM. Especialidad de Edafología. Instituto de Recursos Naturales. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.

- Ayala, P. 2011. Evaluación del desempeño de microorganismos eficaces (EMAS, pgprs) para mejorar la productividad y entomopatógenos (*Metharizium anisoplae*, *Beauveria bassiana*, *Nomurea rielly*) en el control de plagas del cultivo de quinua (*Chenopodium quinoa*) en la granja experimental ECAA. En línea. EC. Consultado 28 abril 2015.
- Bartram, J; Cotruvo, J; Exner, M; Fricker, C; Glasmacher, A. 2003. Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: the significance of HPCs for water quality and human health. (En línea). UK. Consultado, 12 abril de 2015. Formato PDF. Disponible en: http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Bacillus.pdf
- Bautista, A; Etchevers, J; Del Castillo, R; Gutiérrez, C. 2004. La calidad del suelo y sus indicadores. ES. Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente Ecosistemas. Vol. 13, núm. 2.
- Benavides, J; Quintero, G; Guevara, A; Jaimes, D; Gutiérrez, S; Miranda, J. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. Cundinamarca, CO. Revista NOVA, Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. Vol. 4. Núm. 5. p 82-89.
- Blog Microorganismos Eficientes. 2013. Los cinco grupos de los Microorganismos Eficientes. (En línea). ES. Consultado, 12 abril de 2015. Formato HTML. Disponible en: <https://microorganismoseficientes.wordpress.com/2013/05/06/microorganismos-del-em/>
- Bonilla, E. 2015. Curso de microbiología general. (En línea). MX. Consultado, 12 abril de 2015. Formato PDF. Disponible en: <http://depa.fquim.unam.mx/microbio/MG1410/T-Presentaciones/Tema07/T-07-Hongos-142.pdf>
- Camacho, A; Giles, M; Ortegón, A; Palao, M; Serrano B; Velázquez, O. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. (En línea). 2ª ed. MX. Facultad de Química, UNAM. Consultado, 12 abril de 2015. Formato PDF. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-mohos-levaduras_6530.pdf

- Campo, A; Acosta, R; Morales, S; Alonso, F. 2014. Evaluación de Microorganismos de Montaña (MM) en la producción de acelga en la meseta de Popayán. Popayán, CO. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustria. Vol. 12. Núm. 1. p. 86.
- CDC (Centers of Disease Control and Prevention). 2003. Moho. (En línea). USA. Consultado, 12 abril de 2015. Formato PDF. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mold/es/pdfs/faqs.pdf>
- Ciadamidaro, L. 2013. Dinámica de la materia orgánica y de los elementos traza en suelos contaminados reforestados con Salicáceas. Memoria. Doctor. Universidad de Sevilla. Sevilla, EC. p. 23.
- Corona, L; Iturbe, R. 2005. Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. México D.F. MX. Revista INGENIERÍA: Investigación y Tecnología FI-UNAM, vol. VI, Núm. 2. p. 120, 127.
- Cruz, D; Fosados, C; Trejo, V; Zavala, E; Mora, N; Reyes, J; Reyes, S; Roblero, A; Chaires, L. 2015. Aislamiento y Caracterización de *Candida Tropicalis* y *Stenotrophomonas Maltophilia* de Suelos Contaminados con Hidrocarburos. En Instituto Tecnológico Superior de Álamo Temapache. 2015. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Álamo Temapache, MX.
- Dumanski, J; Gameda, S; Pieri, C. 1998. Indicators of land quality and sustainable land management.
- Elein, A; Leyva, A; Hernández, A. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) Revista Colombiana de Biotecnología, vol. 7, núm. 2, p. 47-54.
- Enríquez, J; Viera, J. 2010. Caracterización preliminar de aislamiento de Microorganismos, mediante la técnica de E.M., a nivel de comunidades vegetales en dos zonas de vida ecológicamente diferentes. Tesina de Seminario. Ing. Agropecuario. ESPOL. Guayaquil-Guayas, EC. p 7.
- ESPAM MFL (Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López). 2012. Manual del sistema de investigación institucional. 2a ed. Ecuador. p. 84.

Ferrera, R; Alarcón, A. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. Toluca, MX. Revista Ciencia Ergo Sum. Vol. 8. Núm. 2. p. 175.

_____, R; Rojas, N; Poggi, H; Alarcón, A; Cañizares, R. 2006. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol. 48, Núm. 2 p. 179 – 187

Flores, L; Alcalá, J. 2010. Manual de Procedimientos Analíticos. (En línea). ME. Consultado 28 abril 2015. Formato PDF. Disponible en: <http://www.geologia.unam.mx/igl/deptos/edafo/lfs/manualLFS.pdf>

García, E. 2013. Estrategias para la recuperación de suelos degradados en ambientes semiáridos: Adición de dosis elevadas de residuos orgánicos de origen urbano y su implicación en la fijación de Carbono. Tesis. Doctor. Universidad de Murcia. Murcia, ESP. p. 32.

García, M. 2011. Rehabilitación de un suelo con bajo perfil de nutrientes aplicando biosólidos como fertilizante. (En línea). EC. Consultado 28 abril 2015. Formato PDF. Disponible en: <http://itzamna.bnct.ipn.mx:8080/dspace/bitstream/123456789/11345/1/349.pdf>

García, Y; Ramírez, W; Sánchez, S. 2012. Indicadores de la calidad de los suelos: una nueva manera de evaluar este recurso. Revista cubana. Pastos y Forrajes Vol. 35 Núm. 2

Gisbert, J; Ibáñez, S; Moreno, R. 2012. El espacio poroso del suelo. En línea. ES. Consultado 28 abril 2015. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16873/AD%20espacio%20poroso.pdf?sequence=1>

Gregorich, E; Carter, M; Angers, D; Monreal, C; Ellert, B. 1994. Towards a minimum data set to asses soil organic matter quality.

Hernández, E; Domingo, L. 2012. Comportamiento de los metales pesados en distintos tipos de lechos porosos. Revista Sistemas Ambientales, vol. 5, Núm. 1, p. 41 – 52.

Hernández, R.; Fernández, C.; Baptista, M. 2010. Metodología de la investigación. 5 ed. México D.F. McGraw-Hill/Interamericana Editores, S.A. p 149, 152, 154.

Higa, R. 2009. Tecnología EM. Una solución a todos los problemas ambientales generados por la materia orgánica en el agua, el aire y el suelo. (En línea). AR. Consultado, 12 abril de 2015. Formato PDF. Disponible en:
http://www.fev.org.ar/uploads/2/0/8/5/20850604/agricultura_organica.pdf

Higa, T; Parr, J. (2010). Manual de uso de EM microorganismos benéficos y eficaces. Maryland, EE.UU.

Huerta, E. 2010. Determinación de propiedades físicas y químicas de suelos con mercurio en la región de San Joaquín, QRO., y su relación con el crecimiento bacteriano. (En línea). EC. Consultado 28 abril 2015. Formato PDF. Disponible en:
<http://www.geociencias.unam.mx/~bole/eboletin/tesisHilda1101.pdf>

INECC (Instituto Nacional De Geología Y Cambio Climático). 2004. (En línea) Consultado 28 abril 2015. Formato PDF. Disponible en:
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/448/9.pdf>

INEN (Instituto Ecuatoriano de Normalización). 1998. Agua. Calidad del Agua. Muestreo. Técnicas de muestreo. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2176. p 4.

Liébana, J. 2002. Microbiología Oral. 2 Ed. Madrid, España. McGraw-Hill/Interamericana Editores, S.A. p 228.

Martín, I. 2014? Géneros *Bacillus*. Características generales. (En línea). ES. Consultado, 12 abril de 2015. Formato HTML. Disponible en:
http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=755&Itemid=837

Martínez, M; García, M. 2012. Revisión: Aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. Revista. Mexicana de Ingeniería Química Vol. 11 Núm. 1. p 55

- Martínez, V; López, F. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Revista Mexicana Terra Latinoamericana*, Vol. 19, Núm. 1. p 9-17
- Monroy, M; De Lara, R; Castro, J; Castro, G; Coelho, M. 2013. Composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas al Biofloc en un cultivo de tilapia. México DF, MX. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Vol. 48. Núm. 3. p. 513-517.
- Montaño, N; Sandoval, A; Camargo, S; Sánchez, J. 2010. Los microorganismos: pequeños gigantes. *Revista Mexicana Ciencia y Cultura*, Vol. 17, núm. 77, p. 15-23
- Mora, N; García, A. 2007. Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Tesis. Lcdo. Química en Alimentos. UREH. Pachuca de Soto-Hidalgo. MX. p 12.
- Nápoles, J; Rodríguez, S; Santiago, L; Ábalos, A. 2015. Disminución del extracto orgánico total en suelos contaminados con hidrocarburos. Santiago de Cuba, CU. *Revista Tecnología Química*. Vol. 35. Núm. 3. p 327.
- Ortínez, O; Ize, I; Gavilán, A. 2003. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Revista Mexicana Gaceta Ecológica*, núm. 69, p. 83-92
- Pardo, J; Perdomo, M. 2004. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Revista NOVA, Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. Vol. 2 Núm. 2 p 40-49
- Parra, R. 2010. Review: Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Tunja, CO. *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. Vol. 8. Num. 1. p 94, 95, 99.
- Pascual, M; Calderón, V. 2000. *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. 2 ed. Madrid. ES. Díaz de Santos. p 142.

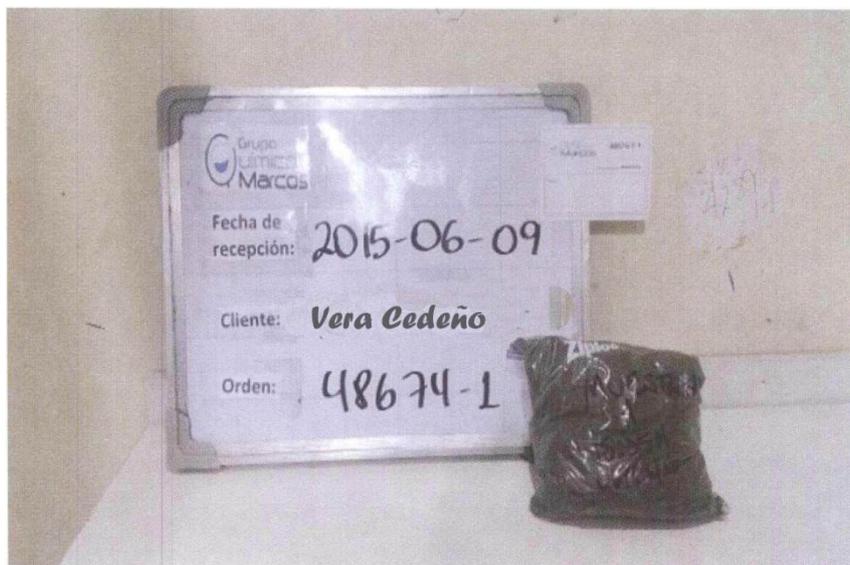
- Peñañiel, B. 2005. Evaluación de diferentes dosis de Microorganismos Eficientes (ME) en el cultivo de pepino (*Cucumis sativus*) híbrido Atar Ha-435. (En línea). EC Consultado, 17 de jul. 2013. Formato PDF. Disponible en: <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/2418/1/4762.pdf>
- Pérez, R; Camacho, M; Gómez, J; Ábalos, A; Viñas, M; Cantero, D. 2008. Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo Revista CENIC. Centro Nacional de Investigaciones Científicas de Cuba. Ciencias Biológicas, vol. 39, núm. 1, p. 44, 45, 51.
- Portal Oficial de la Tecnología EMTM en América Latina. 2008? Activación del EM•1®. (En línea). Consultado, 28 de abril 2015. Formato HTML. Disponible en: http://www.em-la.com/activacion_del_emy1%C2%AE.php?idioma=1
- Prieto, J; González, C; Román, A; Prieto, F. 2009. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. Yucatán, MX. Revista Tropical and Subtropical Agroecosystems. Vol. 10. Núm. 1. p. 29.
- Ramírez, F. 2010. Aislamiento de bacterias *Lactobacillus sp.* y levaduras a partir de productos lácteos artesanales y evaluación de la capacidad antagónica in vitro. Tesis. Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. CO. p 56.
- Ramírez, J; Ulloa, P; Velásquez, M; Ulloa, J; Romero, F. 2007. Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Revista Fuente. Año 2. Núm. 7. p 1.
- Ramírez, M. 2006. Tecnología De Microorganismos Efectivos (EM) Aplicada A La Agricultura Y Medio Ambiente Sostenible. (En línea). EC. Consultado 28 abril 2015. Formato PDF. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/248126826/MICROORGANISMOS-EFICIENTES-TESJS>
- República del Ecuador. 1998. Decreto Ejecutivo N° 1215. (En línea). Consultado, 28 de abril 2015. Formato PDF. Disponible en: http://190.214.22.242:8086/version1.0_Seguridad_salud/normas/LEGISLACION%20AMBIENTAL%20ECUATORIANA/RAOH_DE1215.pdf, p. 57.

- Riojas, H; Torres, L; Mondaca, I; Balderas, J; Gortáres, P. 2010. Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Argentina. Química Viva*, vol. 9, núm. 3, p. 120-145
- Rivera, M; Trujillo, A; Miranda, M; Maldonado, E. 2005. Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleos nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Tabasco, MX. Vol. 30. Núm. 6. p. 327.*
- Rondón, A; Samaniego, L; Bocourt, R; Rodríguez, S; Milián, G; Ranilla, M; Laurencio, M; Pérez, M. 2007. Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus sp.* procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. (En línea). UK. Consultado, 12 abril de 2015. Formato PDF. *Ciencia y Tecnología Alimentaria. Vol. 6. p. 56-63.*
- Rucks, L; García, F; Kaplán, A; Ponce de León, J; Hill, M. 2004. Propiedades Físicas del Suelo. (En línea). UY. Consultado, 17 de jul. 2014. Formato PDF. Disponible en: <http://www.fagro.edu.uy/~edafologia/curso/Material%20de%20lectura/FISICAS/fisicas.pdf>
- Ruda, E. (2004). *Contaminación y Salud del Suelo*. Argentina: UNL
- Sáenz, C; Peralta, M; Rivera, B; Nevárez, G. 2011. Evaluación en la Producción de Biosurfactantes por Levaduras Aisladas de Suelos. En *Universidad Autónoma de Chihuahua. 2011. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. Chihuahua, MX.
- Sainz, H; Echeverría, H; Angelini, H. 2011. Niveles de materia orgánica y pH en suelos agrícolas de la región pampeana y extrapampeana de Argentina. *AR. Informaciones agronómicas. Núm. 2. p 6.*
- Toalombo, R. 2012. Evaluación de microorganismos eficientes autóctonos aplicados en el cultivo de cebolla blanca (*Allium fistulosum*). Tesis. Ing. Agrónoma. UTA. Ambato-Tungurahua. EC. p 29 y 69.

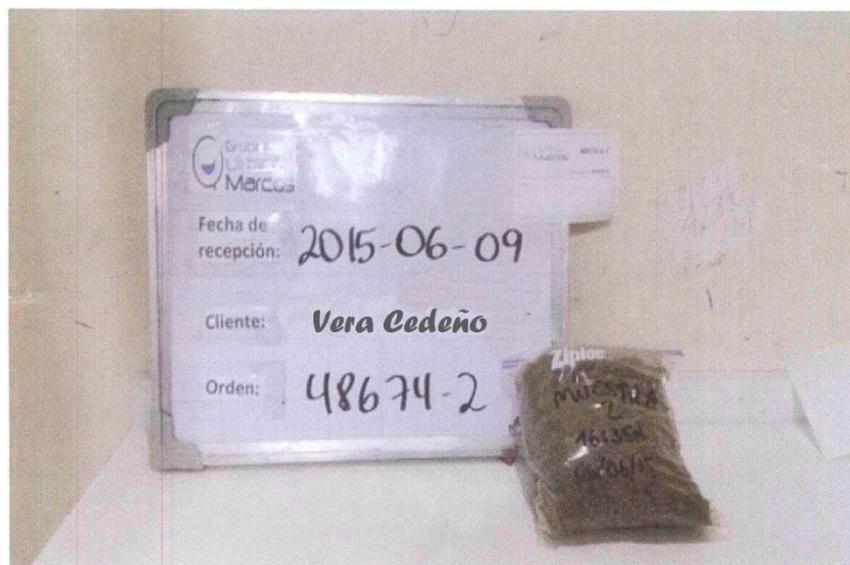
- TULSMA, Libro IV Anexo 2. 2003. Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados.
- Valencia, S; Lizarazo, P. 2009. Caracterización de la composición microbiana de cuatro quebradas del Parque Nacional Natural Gorgona. Medellín, CO. Revista Actualidades Biológicas. Vol. 31. Núm. 91. p. 219.
- Vallejo, V; Salgado, L; Roldán, F. 2005. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. Bogotá, CO. Revista Colombiana de Biotecnología. Vol. VII. Núm. 2. p. 68, 75.
- Villacreces, L. 2013). Artículo científico-Aplicación de oxidación química tipo fentón asistida con detergente para tratamiento de suelos contaminados con petróleo. Tesis. Maestría en Sistemas de Gestión Ambiental. ESPE. Quito-Pichincha, EC. p 4.
- Volke, T; Velasco, J; Pérez, R. 2005. Suelos Contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación, Secretaria de Medio ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Impreso en México. p 19-31.
- Zamora, A; Ramos, J; Arias, M. 2012. Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. Caracas, VE. Revista Bioagro. Vol. 24. Núm. 1. p. 5.

ANEXOS

Anexo 1. Muestras compuestas para ser enviadas los laboratorios del Grupo Químico Marcos.



1-A.- Muestra de suelo compuesta tomada de la Lavadora y Lubricadora Rápidos & Brillosos.



1-B.- Muestra de suelo compuesta tomada del Cañaveral de la ESPAM MFL.

Anexo 2.- Elaboración de los capturadores.



Llenado de las tarrinas con el arroz la melaza y harina de pescado.

Anexo 3.- Establecimiento de los capturadores.



Cavado de los hoyos para sembrar los capturadores.

Anexo 4. Recolección de los capturadores.



Capturadores recuperados luego de tres semanas.

Anexo 5. Preparación de solución madre



Todo el contenido de los capturadores es mezclado con melaza y agua y sellado herméticamente.

Anexo 6. Obtención de la solución madre

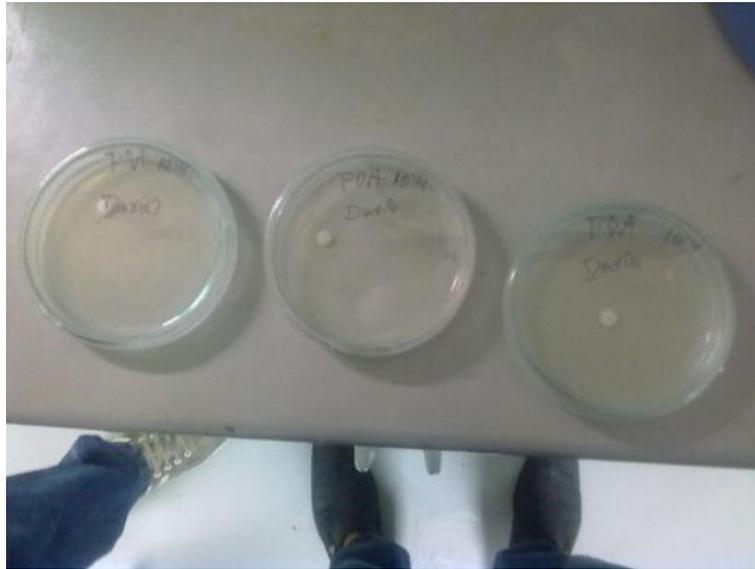


Luego de treinta días se obtiene el coctel de microorganismos.

Anexo 7. Análisis de muestra con microorganismos



Inoculación de las muestras en el medio de cultivo.

Anexo 8. Obtención de resultados de colonias de microorganismos.

8-A.- Levaduras, una colonia en una dilución a la -4



8-B.- Bacterias, colonias incontables en una dilución a la -5

Anexo 9. Activación de los microorganismos



9-A.- Mezcla para activar la EMA cañaveral.



9-B.- Mezcla para activar EMA suelo contaminado.

Anexo 10. Microorganismos activados.



12-A.- EMA cañaveral activados.



12-B.- EMA suelo contaminado activados.

Anexo 11. Análisis de pH a los EMA



11-A.- El pH mostrado en los EMA de suelo contaminado fue de 5.



11-B.- El pH mostrado en los EMA del cañaveral fue de 4.

Anexo 12. Resultados de EMA obtenidos del suelo contaminado y del suelo no contaminado.

	FLORA TOTAL (UFC/ml)	LACTOBACILLUS sp. (UFC/ml)	BACILLUS sp. (UFC/ml)	LEVADURAS (UFC/ml)	MOHOS (UFC/ml)
MUESTRA 1	0,50E+06	0	1,00E+08	1,80E+06	0
MUESTRA 2	0,40E+06	0	4,00E+08	2,00E+06	0
MUESTRA 3	0,80E+06	0	1,00E+08	1,70E+06	1,50E+02
MUESTRA 4	0,80E+06	0,80E+02	1,00E+08	0,80E+06	0
MUESTRA 5	0,80E+06	0	1,00E+08	0,50E+06	0
MUESTRA 6	0,50E+06	0	2,00E+08	10,00E+06	0
MUESTRA 7	0,60E+06	0	10,00E+08	1,80E+06	0
MUESTRA 8	2,00E+06	0	0,80E+08	0,90E+06	2,20E+02
MUESTRA 9	0,50E+06	1,00E+02	5,00E+08	1,80E+06	1,80E+02
MUESTRA 10	0,70E+06	0	4,00E+08	0,10E+06	0

Fuente: Elaboración del autor

12-A.- EMA obtenidos del suelo contaminado. Los datos que se encuentran en 0 indican que la tasa de mortalidad es alta, tanto en Lactobacillus sp. como en Mohos.

	FLORA TOTAL (UFC/ml)	LACTOBACILLUS sp. (UFC/ml)	BACILLUS sp. (UFC/ml)	LEVADURAS (UFC/ml)	MOHOS (UFC/ml)
MUESTRA 1	2,08E+06	1,62E+08	1,19E+07	2,11E+06	1,70E+04
MUESTRA 2	1,96E+06	1,80E+08	2,13E+07	2,23E+06	2,30E+04
MUESTRA 3	2,08E+06	1,62E+08	1,19E+07	2,11E+06	2,10E+04
MUESTRA 4	2,03E+06	1,80E+08	2,13E+07	2,23E+06	1,80E+04
MUESTRA 5	2,06E+06	1,62E+08	1,19E+07	2,11E+06	1,20E+04
MUESTRA 6	1,79E+06	1,80E+08	2,13E+07	2,23E+06	1,50E+04
MUESTRA 7	2,00E+06	1,62E+08	1,19E+07	2,11E+06	1,50E+04
MUESTRA 8	1,96E+06	1,80E+08	2,13E+07	2,23E+06	2,30E+04
MUESTRA 9	2,08E+06	1,62E+08	1,19E+07	2,11E+06	2,10E+04
MUESTRA 10	1,98E+06	1,80E+08	2,13E+07	2,23E+06	2,20E+04

Fuente: Elaboración del autor

12-B.- EMA obtenidos del suelo no contaminado. Los microorganismos presentan una estabilidad en su desarrollo, cada parámetro analizado presenta valores uniformes entre muestra y muestra.