

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS
Y BIOTECNOLÓGICAS**

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



**“BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR
HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (HTP’s) MEDIANTE EL
MÉTODO DE BIOPILAS CON DOS TIPOS DE SUSTRATO (TIERRA Y
ABONOS ORGÁNICOS)”**

Tesis presentada por las Bachilleres:

CCOLQUE CHOQUE, Yobana Maribel

VARGAS MOLINA, Angela Fabiola

**Para optar el Título Profesional de
Ingeniero Biotecnólogo.**

Asesor:

Ing. Cinthia Córdova Barrios.

AREQUIPA - PERÚ

2017

DEDICATORIA

A Dios y a mis amados Padres, Sixto y Cirila; por ser las personas más bonitas e inspiradoras que Dios me dio como progenitores, porque ellos lo son todo para mí, por su gran ejemplo de superación inalcanzable, por su comprensión, confianza, por brindarme un amor incondicional y por apoyarme siempre.

Mama, soy Ingeniera y te dedico esta meta cumplida, gracias porque con tus sabios consejos lograste que yo sea hoy quien soy, por las llamadas de atención que me merecía y que no entendía, por tu paciencia; gracias por ser Tú.

Papá, eres y serás mi ejemplo de superación a seguir, por darme ánimos diciéndome lo orgulloso que te sientes de tus hijos, por tu paciencia y comprensión, decidiste sacrificar tu tiempo para que yo pueda cumplir una meta más, por eso y mucho más te dedico este proyecto.

A mis hermanos, Roly y Arnold; por sus consejos “alentadores”, porque hacen que mis días sean más coloridos y divertidos, porque para mí son los mejores hermanos que Dios me mandó, los quiero mucho.

Y a ti, Juan Gabriel, querido hermanito, que desde el cielo nos proteges y nos mandas sabiduría para enfrentar los problemas.

A todos los que me apoyaron emocionalmente, espero no defraudarlos.

Yobana Maribel Colque Choque.

DEDICATORIA

A mis padres, Angel y Aurelia porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy pude ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí fue lo que me hizo ir hasta el final. Por ustedes, soy lo que soy.

Gracias mamá, por ser la amiga y compañera que me ha ayudado a crecer, gracias por la paciencia que has tenido para enseñarme, por el amor que me das, por tus cuidados que me diste en todo momento, por los regaños que me merecía y que no entendía. Gracias Mamá por estar al pendiente durante toda esta etapa de mi vida.

Gracias papá, que desde el cielo me cuidas, me guías, me proteges, sé que uno de tus deseos más grandes era verme profesional, y ahora al fin puedo decirte... Papá, soy Ingeniera, y saber que estás orgulloso de mí. A pesar del dolor de no tenerte aquí conmigo, saber que me miras desde el cielo me mantiene fuerte.

A mis hermanos Orlando, Gari, Percy, Carlos gracias por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho. Gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida. Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

A mis queridas cuñadas, gracias por el apoyo y el cariño, saben que las quiero como si fueran mis hermanas.

ආ ති ආදරය por tu cariño, tu paciencia y tu confianza. මම ඔයාට ආදරෙයි.

A todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

Angela Fabiola Vargas Molina

AGRADECIMIENTO

A la Ing. Cinthia Córdova Barrios, asesora de tesis, por su apoyo y ayuda con sus conocimientos y experiencia profesional.

Al Dr. Jaime Cárdenas García, al Mgter. Fredy Nicolás Molina Rodríguez y al Blgo. Carlos Eitel Iván Paz Aliaga, miembros jurados de tesis, por sus sugerencias, por su tiempo y apoyo en la culminación de nuestra tesis.

A la Universidad Católica de Santa María y a la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas por brindarnos docentes capacitados para culminar nuestra carrera y las instalaciones requeridas para la ejecución de nuestra tesis.

Al Sr. Marcos Vargas, a la Blga. Jesenia R. Rodríguez Pino y a la Dra. Jesús Zambrano por su paciencia, por su tiempo y apoyo incondicional para la culminación de nuestra meta.

A nuestros padres y hermanos por su amor, por sus palabras de ánimo, por levantarnos cuando pensábamos haber fracasado, gracias por su apoyo.

A nuestras amigas, por habernos acompañado en esta etapa tan importante y por regalarnos momentos muy felices e inolvidables.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIACIONES

INDICE DE ANEXOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I.....2

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....2

1.1. HIPÓTESIS 2

1.2. OBJETIVOS 2

1.2.1. Objetivo General 2

1.2.2. Objetivos Específicos 2

CAPÍTULO II4

MARCO TEÓRICO4

2.1. PETRÓLEO 4

2.1.1. Generalidades 4

2.1.2. Origen o Formación 5

2.1.3. Composición química 6

2.1.3.1. Fracciones de los hidrocarburos 7

2.1.3.2. Derivados del petróleo crudo 11

2.1.3.3. Hidrocarburos totales de petróleo (HTP's): 13

2.2. CONTAMINACIÓN DEL SUELO POR HTP's 13

2.2.1. El suelo 13

2.2.1.1.	Composición del suelo	14
2.2.2.	Características de suelos contaminados	17
2.2.3.	Destino ambiental de hidrocarburos	18
2.2.4.	Impactos ambientales de hidrocarburos	19
2.3.	BIORREMEDIACIÓN	21
2.3.1.	Generalidades:	21
2.3.2.	Factores para la Biodegradación de Hidrocarburos en el suelo	23
2.3.3.	Tecnologías de biorremediación	25
2.3.3.1.	In Situ:	27
2.3.3.2.	Ex situ:	36
2.4.	MICROORGANISMOS EN LA BIORREMEDIACIÓN	43
2.4.1.	Bacterias	45
2.4.2.	Hongos	48
2.5.	IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	50
2.5.1.	Aislamiento de microorganismos:	50
2.5.2.	Caracterización de microorganismos	50
2.5.3.	Identificación Molecular	51
2.6.	METABOLISMO MICROBIANO DE HIDROCARBUROS	52
2.7.	MECANISMO DE BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS	53
2.7.1.	Biodegradación de Hidrocarburos Alifáticos	55
2.7.1.1.	Vía de degradación de <i>n</i> -alcanos	55
2.7.2.	Biodegradación de HAPs	57
2.7.2.1.	Vía de degradación de HAPs	57
2.8.	METODOLOGÍAS PARA DETERMINACIÓN DE HTP'S	60

2.8.1. Extracción de Hidrocarburos	60
2.8.2. Fraccionamiento de Hibrocarburos	61
2.8.3. Cuantificación de Hidrocarburos	61
2.8.4. Identificación de hidrocarburos por Cromatografía de gases – espectrometría de masas (CG/EM).....	62
CAPÍTULO III.....	63
MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
3.1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN	63
3.2. MATERIALES	63
3.2.1. Muestra:.....	63
3.2.2. Material de laboratorio.....	63
3.3. MÉTODOS.....	68
3.3.1. Análisis fisicoquímico de la muestra	68
3.3.1.1. Procedencia y obtención de la muestra.....	68
3.3.1.2. Análisis organoléptico.....	68
3.3.1.3. Determinación de pH.....	69
3.3.1.4. Determinación de humedad:.....	69
3.3.1.5. Determinación de conductividad eléctrica (mS/cm):.....	69
3.3.1.6. Determinación de Materia orgánica	70
3.3.1.7. Preparación de muestra para la determinación de carbonatos, bicarbonatos y cloruros	71
3.3.1.8. Determinación de grasas (Soxhlet):	73
3.3.1.9. Determinación de Nitrógeno total:.....	74
3.3.1.10. Determinación de nitritos, nitratos, Amonio y Sulfatos.....	75
3.3.1.11. Determinación de metales y elementos traza (ICP-AES)	75

3.3.1.12.	Determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo	77
3.3.2.	Aislamiento, caracterización e identificación de microorganismos.....	77
3.3.2.1.	Tratamiento de la muestra.....	77
3.3.2.2.	Aislamiento de microorganismos	78
3.3.2.3.	Identificación de Microorganismos	79
3.3.2.4.	Caracterización Morfológica y Bioquímica.....	80
3.3.3.	Biocompatibilidad de microorganismos.....	83
3.3.4.	Actividad Emulsificante de los microorganismos	83
3.3.5.	Actividad Degradativa de los microorganismos.....	85
3.3.6.	Caracterización Molecular.....	86
3.3.6.1.	Cepas Seleccionadas	86
3.3.6.2.	Extracción de DNA (Método fenol - cloroformo)	86
3.3.6.3.	Amplificación usando PCR.....	87
3.3.6.4.	Secuenciación RNAr 16S y obtención del Árbol Filogenético de cada cepa 88	
3.3.7.	Diseño y construcción de biopilas con “tierra”	88
3.3.7.1.	Construcción de Biopilas con tierra.....	88
3.3.8.	Diseño y construcción de biopilas con “abonos orgánicos”.....	90
3.3.8.1.	Compost	90
3.3.8.2.	Humus:.....	92
3.3.9.	Comparación del porcentaje de remoción de HTP’s.....	95
CAPÍTULO IV		97
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		97
4.1.	Caracterización fisicoquímica del suelo contaminado	97

4.1.1. Procedencia y obtención de las muestras	97
4.1.2. Análisis organoléptico	98
4.2. Aislamiento, caracterización e identificación de microorganismos	109
4.2.1. Aislamiento y caracterización de cepas microbianas	109
4.2.2. Identificación Bioquímica	117
4.3. Biocompatibilidad de microorganismos	128
4.4. Actividad Emulsificante de los microorganismos	130
4.5. Capacidad Degradativa de los microorganismos	131
4.6. Caracterización Molecular de Cepas Seleccionadas	132
4.6.1. Extracción de DNA	133
4.6.2. Secuenciación RNAr 16S de cada cepa y Arbol Filogenético	134
4.7. Diseño y construcción de biopilas con “tierra” y “abonos orgánicos”	137
4.8. Parámetros controlados en los Sistemas de Biopilas	139
4.9. Comparación Estadística de parámetros (HTP’s y Conteo Bacteriano) ..	145
CAPÍTULO V	151
CONCLUSIONES	151
RECOMEDACIONES	153
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	154
ANEXOS	163

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de petróleo.	5
Figura 2. Productos del derivado de Petróleo.	12
Figura 3. Disposición de agregados constituyentes del suelo.	16
Figura 4. Procesos que sufren los contaminantes.	18
Figura 5. Opciones de Tratamiento.	27
Figura 6. Zonas de la planta en donde ocurre cada proceso.	34
Figura 7. Proceso de acondicionamiento del suelo contaminado.	37
Figura 8. Proceso de Biorremediación por biopila.	43
Figura 9. Tamaño comparativo de algunos microorganismos.	44
Figura 10. Apariencias físicas generales de las bacterias.	46
Figura 11. Principios de la degradación microbiana de los hidrocarburos.	53
Figura 12. Rutas de degradación microbiana de n-alcanos.	56
Figura 13. Rutas metabólicas bacterianas en la degradación de HAPs.	59
Figura 14. Método de Kjeldahl.	75
Figura 15. Espectrómetro de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente.	76
Figura 16. Biocompatibilidad.	83
Figura 17. Protocolo de Actividad Emulsificante.	84
Figura 18. Protocolo de Actividad Degradativa.	85
Figura 19. Testigo - tierra.	89
Figura 20. Experimental 1 - tierra.	89
Figura 21. Bosquejo de la compostera.	90
Figura 22. Distribución de capas.	91
Figura 23. Experimental 2 – compost.	92
Figura 24. Bosquejo de la lombricompostera.	92
Figura 25. Divisiones de capas.	93
Figura 26. Experimental 3 - humus.	94
Figura 27. Coordenadas Geográficas.	97

Figura 28. Divisiones de muestreo. A. Superficie: 0 cm; B. Medio: 15 cm de profundidad; C. Inferior: 30 cm de profundidad.....	98
Figura 29. Percepción sensorial	99
Figura 30. Muestras de pH y C.E.....	100
Figura 31. Medición de pH.	101
Figura 32. Determinación de humedad	101
Figura 33. Medición de C.E.....	102
Figura 34. Análisis de grasas	103
Figura 35. Determinación de Carbono Orgánico y Materia Orgánica.....	104
Figura 36. Determinación de Carbonatos	105
Figura 37. Determinación de Bicarbonatos.....	105
Figura 38. Determinación de Cloruros.....	106
Figura 39. Crecimiento microbiano en distintos Medios de Cultivo.	110
Figura 40. Medios Selectivos, A: Medio EMB, B: Medio Manitol Salado, C: Medio Mc Conkey, D: Medio Sangre, E: Medio Cetrimide y F: Medio Nutritivo.	112
Figura 41. Tinción Gram.....	115
Figura 42. Lectura en el Espectrofotómetro.....	130
Figura 43. Lectura con Escala de Mc. Farland.	131
Figura 44. Cepas Seleccionadas.....	133
Figura 45. Amplificación del gen 16S rRNA en gel de agarosa 1%.	133
Figura 46. Árbol Filogenético - Uncultured bacterium	136
Figura 47. Árbol Filogenético - Enterobacter hormaechei	136
Figura 48. Árbol Filogenético - Bacillus sonorensis	136
Figura 49. Árbol Filogenético - Citrobacter youngae	137
Figura 50. Sistema de Biopilas	139
Figura 51. Comparación de pH con respecto al tiempo en las Biopilas.	140
Figura 52. Comparación del % de Humedad con respecto al tiempo	141
Figura 53. Comparación de Temperatura (°C) con respecto al tiempo	142
Figura 54. Comparación de Concentración del consorcio microbiano con respecto al tiempo.....	143

Figura 55. Comparación de la Concentración de HTP's con respecto al tiempo	144
Figura 56. Comparación de medias para HTP's	147
Figura 57. Comparación de medias para Conteo Bacteriano.....	149



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del petróleo crudo.	6
Tabla 2. Fracciones de hidrocarburos.	7
Tabla 3. Ejemplos de Hidrocarburos.....	10
Tabla 4. Número de átomos de carbono en distintas fracciones de crudo.	11
Tabla 5. Tamaño de minerales.	14
Tabla 6. Porcentaje de componentes del suelo.....	16
Tabla 7. Parámetros implicados en la Biorremediación.....	24
Tabla 8. Tratamientos de biorremediación.....	26
Tabla 9. Factores que influyen en los procesos de bioaumentación.....	30
Tabla 10. Tipo de Fitorremediación.....	34
Tabla 11. Variedad de Bacterias usadas en los procesos de Biorremediación.....	47
Tabla 12. Aspectos de un Moho, Levadura y Seta.....	49
Tabla 13. Zona, ubicación y profundidad de muestreo.....	68
Tabla 14. Composición del Caldo Básico de sales modificado.	78
Tabla 16. Composición del Caldo Nutritivo.	79
Tabla 19. Análisis sensorial	98
Tabla 20. Resultados de pH, Humedad, C.E y Grasas.....	99
Tabla 21. Resultados de Carbono Orgánico, Materia Orgánica, Carbonatos, Bicarbonatos y Cloruros.....	103
Tabla 22. Resultados de N, NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , N ^o NH ₄ y SO ₄ ⁼	106
Tabla 23. Resultados de Metales Totales	107
Tabla 24. Resultados de HTP's.....	109
Tabla 25. Descripción morfológica de las 9 cepas.....	113
Tabla 26. Cepas seleccionadas.....	114
Tabla 27. Principales características microscópicas de las cepas.....	115
Tabla 28. Batería de la Cepa 1.	118
Tabla 29. Batería de la Cepa 2.	119
Tabla 30. Batería de la Cepa 3.	120

Tabla 31. Batería de la Cepa 4.	121
Tabla 32. Batería de la Cepa 5	122
Tabla 33. Batería de la Cepa 6.	123
Tabla 34. Batería de la Cepa 7.	124
Tabla 35. Batería de la Cepa 8.	125
Tabla 36. Batería de la Cepa 9.	126
Tabla 37. Pruebas de Catalasa y Oxidasa de las cepas.....	127
Tabla 38. Identificación de microorganismos	128
Tabla 39. Compatibilidad de Cepas.	129
Tabla 40. Actividad Emulsificante.....	130
Tabla 41. Capacidad Degradativa.	132
Tabla 42. BLAST - Cepa 9.....	134
Tabla 43. BLAST - Cepa 3.....	134
Tabla 44. BLAST – Cepa 5.....	135
Tabla 45. BLAST – Cepa 7.....	135
Tabla 46. Biorremediación con Biopilas - Tierra.....	137
Tabla 47. Biorremediación con Biopilas – Compost.	138
Tabla 48. Biorremediación con Biopilas – Humus.	138
Tabla 49. Análisis de la variable HTP's.....	146
Tabla 50. Análisis de ANOVA para HTP's	146
Tabla 51. Análisis de Tukey para HTP's	147
Tabla 52. Análisis de la variable Conteo Bacteriano	148
Tabla 53. Análisis de ANOVA para el Conteo Bacteriano.....	149
Tabla 54. Análisis de Tukey para HTP's	150

LISTA DE ABREVIACIONES

A.E	Actividad Emulsificante
ANCAP	Administración Nacional de Combustibles, Alcohol y Portland
°C	Grados Celsius
CBS	Caldo Básico de sales
C.D	Capacidad Degradativa
cm	Centímetros
cm²	Centímetro cuadrado
COV's	Compuestos Orgánicos Volátiles
COSs	Compuestos orgánicos biodegradables semivolátiles
DS	Decreto Supremo
Ec.	Ecuación
EPA	Agencia de Protección Ambiental
g	Gramo
Ha	Hectárea
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HTP	Hidrocarburo total de Petróleo
Kg	Kilogramo
LP	Gas Licuado
m³	Metro cúbico
mg	Miligramo
m.o	Microorganismo
mEq	Miliequivalente
mL	Mililitro
MINAM	Ministerio del Ambiente
pH	Potencial de Hidrógeno
UFC	Unidad Formadora de Colonia
UAE	Unidad de Actividad Emulsificante
µm	Micrómetro



RESUMEN

En el Perú existen antecedentes de derrames de petróleo desde el año 1978 hasta la actualidad, durante estos 3 últimos años se registró 5 derrames de petróleo; en el 2014 se dio el más grande derrame en Urarinas, Loreto con 3,000 barriles derramados y un total de 60,000 afectados, durante el 2016 se dio en 3 diferentes pueblos entre Amazonas y Loreto con 3,600 barriles y un total de 5,393 afectados. Estos derrames contaminan el medio ambiente perjudicando el ecosistema y la salud, tanto en animales como en humanos; una alternativa biotecnológica a este problema es la biorremediación, que consiste en la biodegradación de hidrocarburos.

En el presente trabajo se evaluó la biorremediación de Hidrocarburos Totales de Petróleo, mediante el uso de sistemas de biopilas con dos sustratos (tierra y abonos orgánicos); con el objetivo de reducir el porcentaje de HTP's en los suelos procedentes de un taller mecánico con el consorcio bacteriano aislado.

Se realizó el análisis fisicoquímico de las muestras de suelo, procedente del “Taller Mecánica Automotriz 54”, según las metodologías planteadas por el Ministerio del Ambiente del Perú. Se aislaron cepas bacterianas y se hizo la caracterización microbiológica mediante tinción Gram y pruebas bioquímicas.

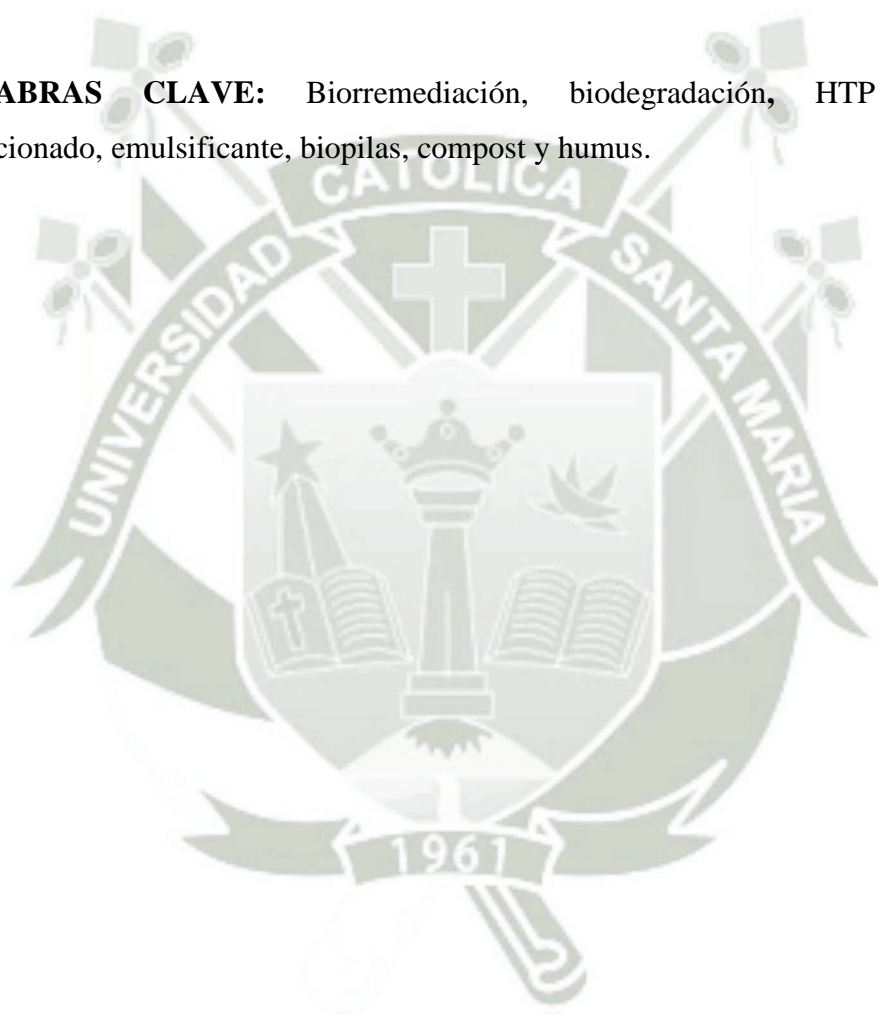
A cada cepa obtenida se le realizó la prueba de actividad emulsificante (A.E) planteada por Goldman y col. en 1982 y la prueba de capacidad degradativa (C.D) según Mills y col. 1978. El rango de la Actividad Emulsificante estuvo entre **0.84 UAE/mL** y **2.31 UAE/mL**; mientras que, la Capacidad Degradativa alcanzó un valor máximo de (3+) y un mínimo de (2+).

En las pruebas mencionadas anteriormente, 4 cepas dieron resultados óptimos, a las cuales se les realizó la caracterización molecular, mediante la extracción de DNA, amplificación del gen 16S rRNA. Estas cepas fueron identificadas como: *Uncultured bacterium* (cepa 9); *Citrobacter youngae* (cepa 7); *Bacillus sonorensis* (cepa 5) y *Enterobacter hormaechei* (cepa 3).

Se acondicionaron cuatro biopilas cada una con 10 kg de suelo contaminado con petróleo crudo. La primera biopila sirvió de “Testigo” para determinar la degradación por consorcio bacteriano nativo, con una concentración inicial a 0 días de 3.38×10^5 UFC/mL (100%) y una final a 40 días de 5.88×10^4 UFC/mL (17.3%); en la segunda biopila (**Exp 1**), se hizo con sustrato “tierra”, se inoculó en el día 0 con el consorcio seleccionado, con una concentración inicial de 9.73×10^8 UFC/mL (100%) y a los 40 días se obtuvo una concentración final de 2.25×10^6 UFC/mL (0.23%); mientras que en las biopilas (**Exp 2 y Exp 3**), se hizo con los sustratos “compost” y “humus”, se inocularon el día 0 con el consorcio seleccionado, con una concentración inicial de 8.93×10^8 UFC/mL (100%) y de 8.31×10^8 UFC/mL (100%), respectivamente; y a los 40 días se obtuvo una concentración final de 1.96×10^6 UFC/mL (0.22%) y 3.74×10^7 UFC/mL (4.5%), respectivamente. Cada veinte días se monitoreó pH, humedad, temperatura, número de microorganismos y concentración de HTP's.

Esta investigación demostró que el consorcio bacteriano seleccionado aislado, tuvo mayor porcentaje de biorremediación en la biopila **Exp 1** con el sustrato “tierra” dando un 38.7% de remoción de HTP’s a 40 días, mientras que en las biopila **Exp 2** y **Exp 3** con el sustrato “compost” y “humus” dando un 37.9% y 3.1% de remoción de HTP’s a 40 días, respectivamente.

PALABRAS CLAVE: Biorremediación, biodegradación, HTP’s, consorcio seleccionado, emulsificante, biopilas, compost y humus.





ABSTRACT

In Peru there is a history of oil spills from 1978 to the present, during the last 3 years there were 5 oil spills; In 2014 the largest spill happened in Urarinas, Loreto with 3,000 barrels spilled and a total of 60,000 affected, during 2016 occurred in 3 different villages between Amazonas and Loreto with 3,600 barrels and a total of 5,393 affected. These spills pollute the environment, damaging the ecosystem and health, both in animals and humans; a biotechnological alternative to this problem is bioremediation, which consists of the biodegradation of hydrocarbons.

In this work we evaluated the bioremediation of Total Petroleum Hydrocarbons, through the use of biopile systems with two substrates (soil and organic fertilizers); with the aim of reducing the percentage of TPH's in soils from the mechanical workshop with the isolated bacterial consortium.

The physicochemical analysis of the soil samples from the "Automotive Mechanics Workshop 54" was carried out, according to the methodologies proposed by the Ministry of the Environment of Peru. Bacterial strains were isolated and microbiological characterization was done by Gram stain and biochemical tests.

Each strain obtained was tested for emulsifying activity (E.A) raised by Goldman et al. in 1982 and the degradative capacity test (D.C) according to Mills et al. 1978. The range of the Emulsifying Activity was between 0.84 UAE / mL and 2.31 UAE / mL; while the Degraded Capacity reached a maximum value of (3+) and a minimum of (2+).

In the aforementioned tests, 4 strains gave optimum results, to which the molecular characterization was performed, by DNA extraction, amplification of the 16S rRNA gene. These strains were identified as: Uncultured bacterium (strain 9); *Citrobacter youngae* (strain 7); *Bacillus sonorensis* (strain 5) and *Enterobacter hormaechei* (strain 3).

Four biopiles were conditioned each with 10 kg of soil contaminated with crude oil. The first biopile served as a "Witness" to determine degradation by native bacterial consortium, with an initial concentration at 0 days of 3.38×10^5 CFU / mL (100%) and a 40 day end of 5.88×10^4 CFU / mL (17.3 %); In the second biopile (Exp 1), was made with substrate "soil", inoculated on day 0 with the selected consortium, with an initial concentration of 9.73×10^8 CFU / mL (100%) and at 40 days a Final concentration 2.25×10^6 CFU / mL (0.23%); While the compost and humus substrates were inoculated on biopiles (Exp 2 and Exp 3), inoculated on day 0 with the selected consortium, with an initial concentration of 8.93×10^8 CFU / mL (100%) And 8.31×10^8 CFU / mL (100%), respectively; And at 40 days a final concentration of 1.96×10^6 CFU / mL (0.22%) and 3.74×10^7 CFU / mL (4.5%), respectively, was obtained. Twenty days were determined pH, humidity, temperature, number of microorganisms and concentration of TPH's.

This research proved that the isolated selective bacterial consortium had a higher percentage of bioremediation in the biopila **Exp 1** with the substrate "soil" giving a 38.7%

removal of TPH's for 40 days, while in the biopila **Exp 2 and Exp 3** with substrate "compost" and "humus" giving a 37.9% and 3.1% removal of TPH's at 40 days, respectively.

KEY WORDS: Bioremediation, biodegradation, HTP's, selective consortium, emulsifier, biopilas, soil, compost and humus.



INTRODUCCIÓN

Hoy en día, los procesos para la reducción de hidrocarburos contaminantes están en proceso de investigación y son muy promisorios gracias a que se pueden alcanzar altas eficiencias de reducción. La contaminación del medio ambiente por acumulación de hidrocarburos contaminantes como petróleo, benceno, alquitrán, kerosene y gasolina se va incrementando afectando la salud humana y por ende el ambiente; una propuesta para biorremediar dicha contaminación es con los propios microorganismos aislados de los lodos contaminados por hidrocarburos, lo cual conlleva a un menor riesgo sanitario ambiental.

La acumulación de estos contaminantes en el medio ambiente ya sea en agua o suelo, genera un gran problema debido a su difícil remoción, es por eso que se busca nuevas tecnologías para descontaminar y una de ellas es la biorremediación con biopilas, utilizando microorganismos nativos que tengan capacidad degradativa de los contaminantes. Existen otros métodos de remediación de suelos contaminados como: bioventeo, bioaumentación, bioestimulación, atenuación natural, fitorremediación, landfarming, slurry, micorremediación; cada uno de estos métodos tienen ciertas limitaciones, ya sea, el costo, tiempo, materiales, efectividad de resultados, etc.

En este proyecto se innovó un método ya existente para el tratamiento de lodos contaminados con hidrocarburos con una mínima inversión, que generarán grandes beneficios sanitarios al sector industrial, comercial, minero, etc. en el ámbito económico, social y científico.

En el presente trabajo de investigación se pretende aislar un consorcio de microorganismos que degraden los hidrocarburos del suelo procedentes del “Taller Mecánica Automotriz 54”, para luego diseñar sistemas de biopilas con el uso de dos sustratos como tierra y abonos orgánicos, en estos sistemas se añadirá el consorcio aislado para llevar a cabo la Biorremediación.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. HIPÓTESIS

Si se sabe que existe biodiversidad microbiana de interés biotecnológico que sobreviven en condiciones extremas como en suelos contaminados por hidrocarburos, es posible aislar un consorcio microbiano a partir de suelos contaminados con HTP's y que pueden ser utilizados en sistemas de biopilas con el uso de tierra y abonos orgánicos para la remoción de hidrocarburos totales presentes.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo General

- Biorremediar suelos contaminados por hidrocarburos totales de petróleo (HTP's) mediante el método de biopilas con dos tipos de sustrato (tierra y abonos orgánicos).

1.2.2. Objetivos Específicos

- Analizar fisicoquímicamente la muestra de suelo contaminada con HTP's.
- Aislar, caracterizar e identificar cepas microbianas nativas procedentes de suelos contaminados con HTP's.
- Determinar la Actividad Emulsificante y Capacidad Degradativa de las cepas microbianas aisladas.
- Diseñar y construir el sistema de biopilas con el sustrato "tierra" para la biorremediación de suelos contaminados con HTP's.

- Diseñar y construir el sistema de biopilas con el sustrato “abonos orgánicos” para la biorremediación de suelos contaminados con HTP’s.
- Determinar la tasa de crecimiento de las cepas microbianas y monitorear los parámetros a controlar en cada uno de los sistemas.
- Comparar estadísticamente el porcentaje de remoción de HTP’s entre las biopilas con dos tipos de sustrato (tierra y abonos orgánicos).



CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. PETRÓLEO

2.1.1. Generalidades

Etimológicamente la palabra petróleo, gramaticalmente significa “aceite de roca”, **Petro: roca** y **óleum: aceite**¹. El petróleo es una sustancia oleosa, se piensa que todos los crudos son de color negro, lo cual ha dado origen al nombre: “oro negro”, “más negro que petróleo crudo”². Sin embargo, por transmisión de la luz, los crudos pueden tener color amarillo pálido, tonos de rojo y marrón hasta llegar a negro. Los crudos pesados y extrapesados son negros casi en su totalidad. Crudos con altísimo contenido de cera son livianos y de color amarillo; por la noche al bajar bastante la temperatura tienden a solidificarse notablemente. El crudo más liviano o condensado llega a tener un color blanquecino, lechoso y a veces se usa en el campo como gasolina cruda¹.

Olor

El olor de los crudos es aromático como el de la gasolina y del kerosene. Si el crudo contiene azufre tiene un olor fuerte y hasta repugnante, como huevo podrido. Si contiene sulfuro de hidrógeno, los vapores son irritantes, tóxicos y hasta mortíferos¹.

Punto de ebullición y congelación

El punto de ebullición varía desde temperatura atmosférica hasta la temperatura igual o por encima de 300 °C debido a sus constituyentes. El punto de congelación varía desde 15,5 °C hasta la temperatura de -45 °C. Dependiendo de las propiedades y características de cada crudo o derivado¹.

2.1.2. Origen o Formación

Los hidrocarburos provienen de la descomposición de los tejidos de plantas y animales que se acumularon en el fondo de lagos y mares en sucesivas capas de sedimentos inorgánicos –arenas y arcillas– se depositaban encima, enterrándolos cada vez más profundamente³. La materia orgánica de las profundidades, es sometida a la acción de las bacterias con ausencia de oxígeno, a la temperatura (hasta 150°C) y presión elevada (170 -180 Kg/cm²) de las capas de sedimentos que se depositaron encima, en el transcurso del tiempo sufrió reacciones químicas que dieron origen a la formación de los distintos hidrocarburos, por lo tanto, al petróleo crudo. El proceso de descomposición de la materia orgánica y la formación del petróleo tarda entre 10 y 100 millones de años.

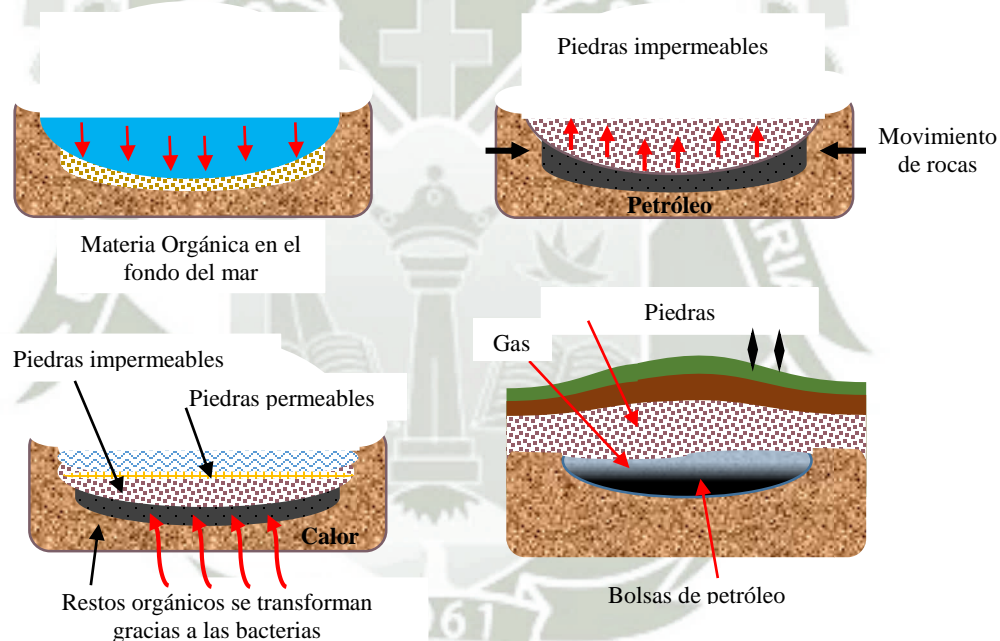


Figura 1. Formación de petróleo⁴.

El petróleo se encuentra bajo tierra con profundidades variables desde pocos metros hasta profundidades mayores a cinco mil metros, distribuida por todo el mundo, en lugares conocidos como “cuencas sedimentarias”⁵. Estas bolsas de petróleo flotan en agua salada y sobre este, una capa de hidrocarburos gaseosos, cuya capacidad es muy

variable. La distribución territorial del petróleo es muy irregular, aunque la mayoría de las reservas, del orden del 60%, se encuentran en Oriente Medio⁴.

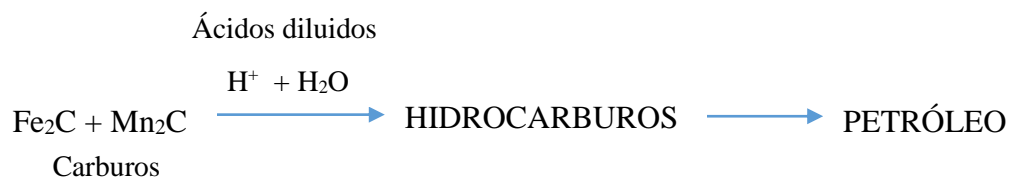
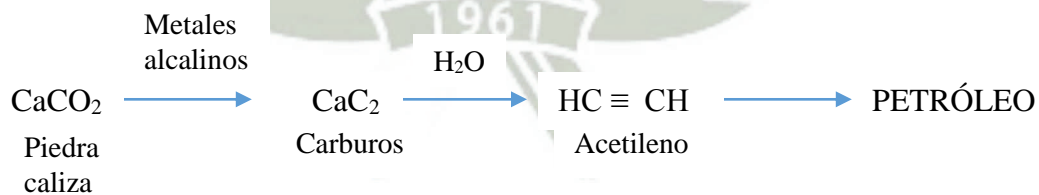
2.1.3. Composición química

El petróleo está constituido por una mezcla de compuestos sólidos, líquidos y gaseosos, denominados hidrocarburos, especialmente del tipo alcanos y aromáticos pesados. La composición media del petróleo sería:

Tabla 1. Composición del petróleo crudo⁶.

Porcentaje	Compuesto
84 – 87 %	Carbono
11 – 14 %	Hidrógeno
0 – 8 %	Azufre
0 – 4 %	O , N, Ni, V

De acuerdo al número de átomos de carbono, de hidrógeno y de la distribución estructural de las mismas, se tienen los distintos hidrocarburos que abarcan desde el gas natural, hidrocarburos líquidos (petróleo) hasta los hidrocarburos sólidos (asfaltitas). Su reacción sería de la siguiente manera:



Es insoluble en agua y su densidad está comprendida entre 0,75 y 0,95 g/mL, por lo tanto, es menos denso que el agua (densidad 1 g/mL). La composición del crudo varía dependiendo de la familia del hidrocarburo, estos se dividen en cuatro fracciones: saturados, aromáticos, asfaltenos y resinas⁷.

Tabla 2. Fracciones de hidrocarburos⁸.

Fracción	Composición
Saturados	<i>n</i> -alcanos, alcanos de cadena ramificada e isoprenoides, y cicloparafinas o cicloalcanos, hopanos.
Aromáticos	Hidrocarburos monoaromáticos, diaromáticos, aromáticos policíclicos (HAP)
Resinas	Agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas
Asfaltenos	Agregados de HAP, ácidos nafténicos, sulfuros, ácidos grasos, metaloporfirinas, fenoles polihidratados.

2.1.3.1. Fracciones de los hidrocarburos

- ✓ **Hidrocarburos Saturados:** También llamados alifáticos, dentro de esta fracción, los de cadena lineal que van desde C₁₀ – C₂₀ son más fáciles de degradar, mientras que los que tienen ramificaciones tienen un alto grado de resistencia a la degradación biológica⁹.
- **Parafinas volátiles (n-alcanos e isoprenoides volátiles):** Constituyen el 30% del petróleo crudo y es la fracción más volátil, por lo tanto, es susceptible a la volatilización. Los n-alcanos tienen un tamaño de C₁- C₁₀, la fracción de gas natural contiene, principalmente C₁-C₅. Los de mayor peso molecular disminuyen su presencia en el crudo incrementando su peso molecular⁹.


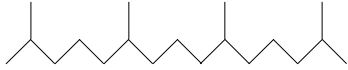
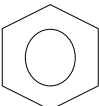
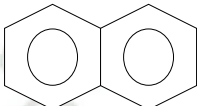
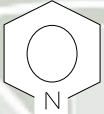
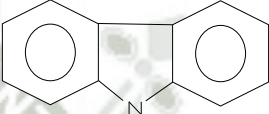
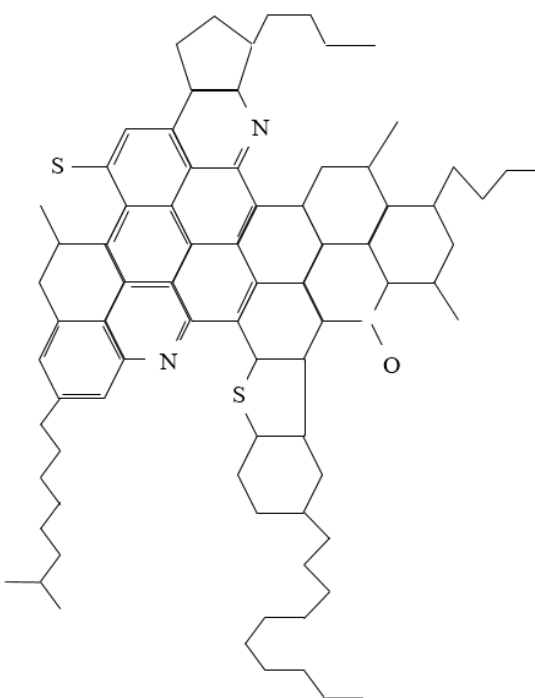
- **Parafinas no volátiles (n-alcenos e isoprenoides):** Los n-alcenos tienen un tamaño de C_{11} - C_{40} y constituyen el 15 – 20% del crudo no degradado. En cambio, los isoprenoides de C_{12} – C_{22} , constituyen el 1 – 2% del crudo, llegando al 15% en crudos degradados⁹.
 - **Naftenos (cicloalcenos):** Los compuestos más abundantes en este grupo son metilados y constituyen el 31% del crudo. Los compuestos mono y dicíclicos representan el 50-55% de esta fracción, los tricíclicos al 20% y los tetracíclicos al 25%.
 - **Oleofinas (alquenos):** Constituyen una mínima parte en el crudo de petróleo, es decir, en concentraciones traza. Estos se generan en el proceso de refinado, en las gasolinas un 30% y en fueles un 1%.
- ✓ **Hidrocarburos aromáticos:** También llamados hidrocarburos cíclicos, debido al fuerte aroma que los caracteriza, se consideran compuestos derivados del benceno. En esta fracción las moléculas contienen uno o varios anillos bencénicos en su estructura. Podemos encontrar hidrocarburos monoaromáticos (un anillo bencénico), diaromáticos (2 anillos bencénicos) y poliaromáticos (HAPs, con más de dos anillos bencénicos).
- **Hidrocarburos monoaromáticos:** Son los que se forman por la sustitución de los átomos de hidrógeno del benceno por grupos alquilo. Se puede encontrar el benceno, el tolueno, etilbenceno y el xileno (BTEX), estos, tienen una gran importancia debido a su volatilidad, toxicidad y por ser abundantes en combustibles fósiles¹⁰.
 - **Hidrocarburos poliaromáticos:** Conocidos también como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's). Representan el mayor porcentaje de

hidrocarburos aromáticos presentes en el crudo, ya que se producen por la combustión incompleta de materia orgánica¹¹. El más conocido es el naftaleno. También se pueden incluir compuestos muy relacionados con los hidrocarburos aromáticos que contienen anillos aromáticos heterocíclicos con azufre o nitrógeno¹⁰.

Los HAP's con bajo peso molecular, ya sea, 2 o 3 anillos son más fácil de degradar por ser semivolátiles y tener mayor volatilidad¹². Y los HAP's con elevado peso molecular, ya sea con 4 o más anillos tienen baja solubilidad y están asociados con la materia orgánica, lo que impide su degradación en totalidad¹³.

- ✓ **Resinas y Asfaltenos:** Son mezclas complejas de núcleos policíclicos o naftenoaromáticos. Estos tienen cadenas hidrocarbonadas con heteroátomos de oxígeno, nitrógeno y azufre (componentes NOS del petróleo), algunas veces están asociadas con concentraciones de vanadio y el níquel. Representan entre un 10% de crudos poco degradados, hasta un 60% de crudos muy degradados; algunas son las piridinas, los HAP, los ácidos grasos⁶.

Tabla 3. Ejemplos de Hidrocarburos

Alifáticos	<p style="text-align: center;">n-alcenos</p> 	<p style="text-align: center;">Isoprenoides</p> 
Aromáticos	<p style="text-align: center;">Monoaromáticos - benceno</p> 	<p style="text-align: center;">Poliaromáticos - naftaleno</p> 
Resinas	<p style="text-align: center;">Piridinas</p> 	<p style="text-align: center;">Carbazoles</p> 
Asfaltenos	<p style="text-align: center;">Molécula de elevado peso molecular</p> 	

La **Tabla 4**, nos muestra el número de carbonos en las distintas fracciones del crudo.

Tabla 4. Número de átomos de carbono en distintas fracciones de crudo¹⁴.

Fracciones	Número de átomos de Carbono
Gas incondensable	$C_1 - C_2$
Gas licuado (LP)	$C_3 - C_4$
Gasolina	$C_5 - C_9$
Kerosene	$C_{10} - C_{14}$
Gasóleo	$C_{15} - C_{23}$
Lubricantes y parafinas	$C_{20} - C_{35}$
Combustóleo pesado	$C_{25} - C_{35}$
Asfaltos	$> C_{39}$

2.1.3.2. Derivados del petróleo crudo

El petróleo crudo no tiene un uso importante, pero es una materia prima orgánica ya que tiene un gran potencial para convertirse en una infinidad de productos. El refinado del petróleo crudo es un proceso por el cual el hidrocarburo se calienta a $400^{\circ}C$ para poder ser destilado y separado. A este se le llama Cracking. Y por este proceso se pueden realizar diversos derivados del petróleo que se encuentran en nuestro día a día¹⁵. Estos productos son:

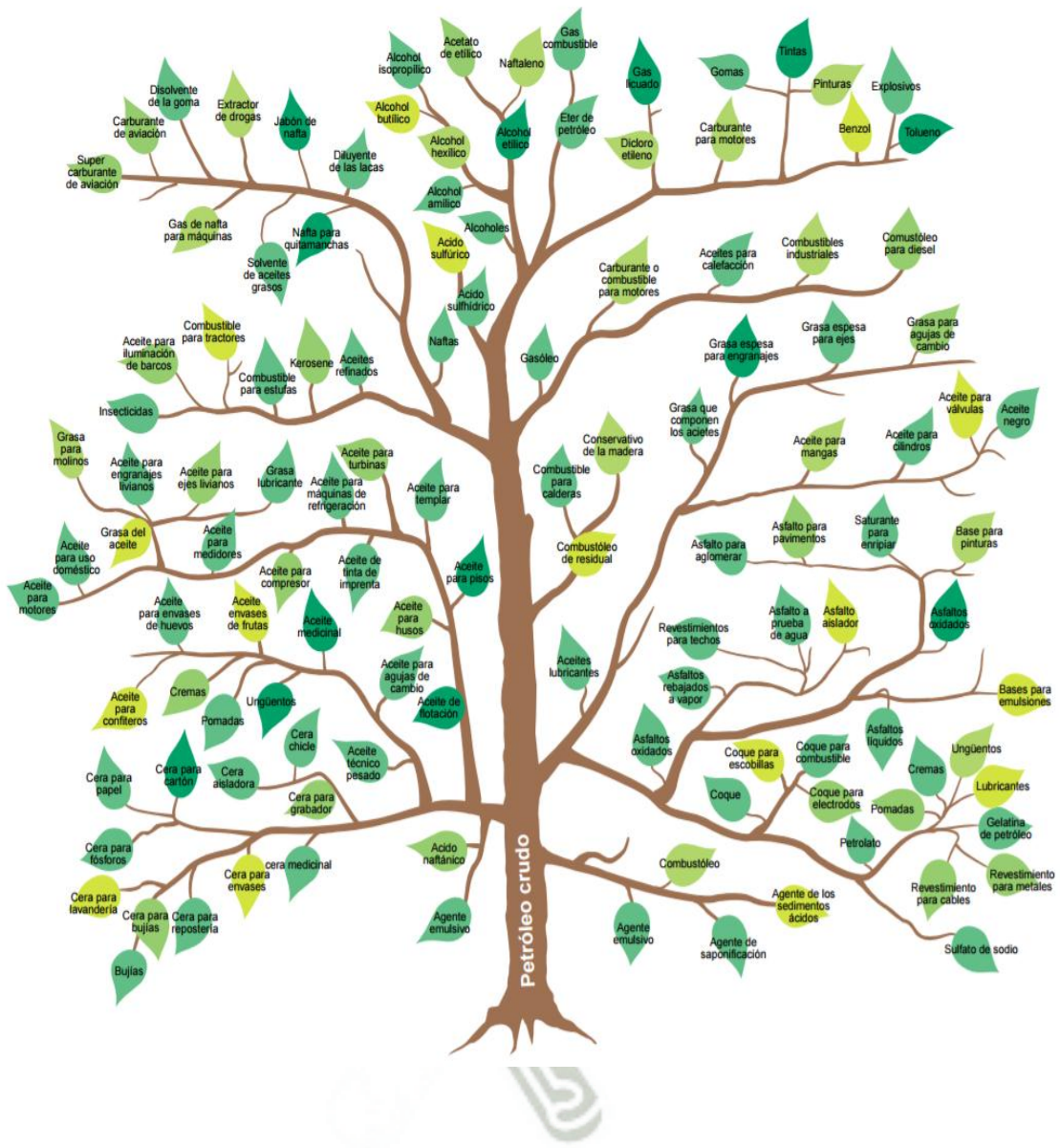


Figura 2. Productos del derivado de Petr leo².

2.1.3.3. Hidrocarburos totales de petróleo (HTP's):

Este término se usa para describir la gran familia de compuestos químicos originados de petróleo crudo

Todos estamos expuestos a los HTP's de diferentes fuentes, incluyendo gasolineras, aceite derramado sobre el pavimento, y sustancias químicas usadas en el hogar y en el trabajo. Algunos compuestos de los HTP's pueden afectar al sistema nervioso, produciendo dolores de cabeza y mareo. Se ha encontrado HTP's en por lo menos 23 de los 1,467 sitios de la Lista de Prioridades Nacionales identificados por la Agencia de Protección Ambiental (EPA)

2.2. CONTAMINACIÓN DEL SUELO POR HTP's

2.2.1. El suelo

Según el DS N° 002-2013- MINAM, el suelo es un material no consolidado, ya que el agua subterránea se mueve entre sus poros, y que está compuesto por partículas inorgánicas, materia orgánica, agua, aire, organismos y microorganismos, que van a interactuar entre ellos para crear un equilibrio dinámico; esto se presenta en su capa superior así como en distintos niveles de profundidad¹⁶. El suelo se forma por la descomposición de rocas a lo largo de millones de años, gracias a factores como el clima y la intervención de los seres vivos¹⁶. Se puede dar por una descomposición física gracias a la acción del sol, viento, agua y por una descomposición química causada por el ácido Carbónico y ácidos orgánicos formados por la descomposición de animales muertos y plantas¹⁶.

El suelo suministra nutrientes para el crecimiento de plantas y microorganismos. Existen diferentes microorganismos como bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoos que están presentes en ellos, pero que varían de acuerdo al tipo de suelo. En la superficie de los suelos se producen reacciones bioquímicas de la materia

orgánica, el nitrógeno, minerales y el consumo de nutrientes por parte de las plantas. Algunas propiedades físicas y químicas son importantes para la aireación, la disponibilidad de nutrientes y la retención de agua y, por lo tanto, en la actividad biológica. Las propiedades que se toman en cuenta son el tamaño de partícula, la porosidad, la humedad, estado de aireación, composición química, fracción de arcilla, capacidad de intercambio de cationes y fracción orgánica. El tamaño de partícula afecta a la química de la superficie de los suelos y al tamaño de los poros. La cantidad de poros depende de la textura, estructura y contenido de materia orgánica del suelo¹⁷.

2.2.1.1. Composición del suelo

El suelo está compuesto por 5 componentes importantes:

- **Minerales:**

Las rocas y los minerales se encuentran en mayor proporción en la composición de suelo. Estos provienen de materiales inertes e inorgánicos. Dependiendo del tipo de roca del que se ha formado el suelo, los minerales serán diferentes en sus concentraciones¹⁶. Los minerales se clasifican por su tamaño:

Tabla 5. Tamaño de minerales¹⁶.

Mineral	Tamaño
Arenas	60 – 2000 μm
Limos	2 – 60 μm
Arcillas	Menos de 2 μm

La arena está formada por porciones de cuarzo y otros minerales, es por esto que no tiene los nutrientes necesarios para las plantas. Los suelos con este

tipo de mineral son sueltos y fácil de drenar, el agua pasa a través de ella más fácilmente que en otros tipos de suelo.

El limo está formado por rocas de cuarzo y otros. Las partículas de limo son más pequeñas que la arena, pero más grandes que la arcilla. Los suelos con este tipo de mineral son pesados, bajo en nutrientes y no muy fáciles de drenar.

La arcilla es la más rica de los minerales del suelo, y contiene nutrientes como hierro, potasio y calcio. Las partículas más pequeñas del suelo provienen de la arcilla, la cual es muy densa, no drenan ni se desecan^{16, 18}.

- **Materia Orgánica:**

La materia orgánica está formada por plantas y los animales en descomposición. Gracias a la descomposición, la materia orgánica se convierte en nutrientes para que las plantas puedan crecer. Contiene carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y potasio^{16, 18}.

La materia orgánica y los minerales generan una estructura porosa, donde puede haber agua o aire. En el agua, contenida en los poros se encuentran minerales y nutrientes, por lo tanto, es donde se desarrolla la actividad metabólica de los microorganismos del suelo.

- **Aire – Agua:**

El aire del suelo se encuentra en los poros entre las partículas minerales; en esos poros el agua es retenida. Si los poros son pequeños el suelo sería compacto, pesado y el crecimiento sería pobre. Y si los poros son grandes los suelos serían sueltos y se secarían rápido. La aireación también es muy importante para el crecimiento de los microorganismos^{16, 18}.

El agua en el suelo contiene sales disueltas. En el caso de los suelos arcillosos, el agua es retenida mucho mejor que otros tipos de suelos. Cuando

el agua permanece en el suelo en lugar de pasar a través de él fácilmente, el suelo se vuelve más denso^{16, 18}.

- **Organismos vivos:**

Son organismos vivos las plantas y animales de distinto tamaño, insectos y lombrices. Estos organismos ayudan a la descomposición liberando nutrientes; el peso de estos organismos es pequeño y menos de la décima parte de la materia orgánica^{16, 18}.

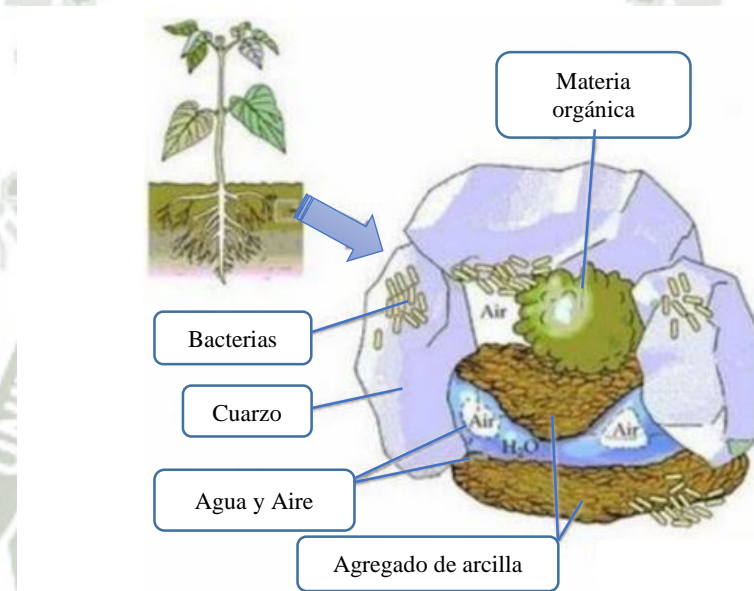


Figura 3. Disposición de agregados constituyentes del suelo¹⁶.

El porcentaje de componentes de los suelos es el siguiente:

Tabla 6. Porcentaje de componentes del suelo^{16, 18}.

Componente	Porcentaje (%)
Minerales	40 - 50
Materia Orgánico - Organismos Vivos	3 - 8
Aire	12 - 35
Agua	12 - 35

2.2.2. Características de suelos contaminados

El suelo es uno de los medios más vulnerables cuando se habla de contaminación. El DS N° 002-2013- MINAM nos define el suelo contaminado como aquel cuyas características químicas han sido alteradas de manera negativa por la presencia de sustancias químicas contaminantes depositadas por la actividad humana y que representan un riesgo para la salud humana y el ambiente.

Las consecuencias de esta contaminación del suelo son muy graves, ya que, la vegetación y la producción de biomasa se pueden ver afectadas porque interrumpen el ciclo de nutrientes, afectan a la hidrósfera y ponen en peligro los recursos hídricos subterráneos. En casos de una contaminación extrema donde se observa riesgo para la salud humana y del medio ambiente, lo más recomendable sería la recuperación de suelos¹⁹. En la actualidad es necesario poder desarrollar tecnologías para evaluar la contaminación y monitorearla, así con el tiempo poder remediarla de una forma sostenible. En la industria de hidrocarburos, en todo su proceso de refinado, crudo y derivados, se producen una cantidad de desechos considerables que deben ser guardados en lugares seguros hasta que vuelvan a ser utilizados o tratados²⁰. Los accidentes que se producen van a alterar los procesos naturales, ya que afectan su productividad o modifican el hábitat de las especies, así como, el paisaje²¹. Esto puede desencadenar problemas para la salud humana, es por este motivo que existen parámetros o límites máximos permisibles de contaminación de acuerdo a las leyes de cada país.

La contaminación de suelos por hidrocarburos es uno de los problemas más importantes tanto en países productores, como en los exportadores de petróleo; un ejemplo es el caso de Ecuador que exporta un 43 – 46% de petróleo, los derrames han afectado la Amazonía, perjudicando las plantas, animales y por lo tanto, a los humanos.

Las propiedades físicas del suelo que son más afectadas por los derrames de hidrocarburos son:

- La estructura del suelo por la ruptura de los agregados.
- Incremento de la retención de agua en la capa superficial.
- El potencial hídrico²².

Las propiedades químicas del suelo que son más afectadas por los derrames de hidrocarburos son:

- Disminución del pH, por la acumulación del carbono orgánico y la generación de ácidos orgánicos.
- Incremento del manganeso y hierro intercambiable.
- Incremento del fósforo disponible²².

2.2.3. Destino ambiental de hidrocarburos

Estos contaminantes cuando son introducidos al medio ambiente, en este caso al suelo, pueden pasar por diferentes fenómenos, ya sean físicos, químicos y biológicos, que producen su transformación, eliminación y transporte hacia otros lugares. Algunos procesos a los cuales estos contaminantes se enfrentan son:

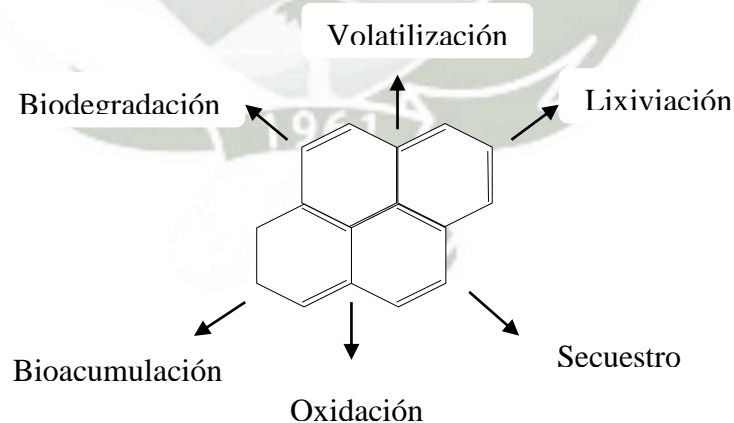


Figura 4. Procesos que sufren los contaminantes²³.

En muchos casos estos procesos tienen como resultado la degradación microbiana, catalizada por bacterias. La biorremediación es el método potencial degradador, ya que son usados como alternativa, o de forma complementaria a otros tratamientos²⁴. La contaminación de suelos es una de las consecuencias de la actividad industrial²⁵. Los contaminantes pueden estar adsorbidos por las partículas o la materia orgánica. Los HAP's son hidrofóbicos; los aceites minerales, suelen estar adsorbidos²⁶.

2.2.4. Impactos ambientales de hidrocarburos

Cualquier tipo de hidrocarburos, ya sea, crudo o refinado, daña los ecosistemas produciendo los siguientes efectos:

- Muerte de los organismos por asfixia.
- Destrucción de los organismos.
- Aumento de infecciones en las especies, especialmente aves, por absorción de ciertas cantidades sub-letales de petróleo.
- Efectos negativos sobre la reproducción y propagación a la fauna y flora marina.
- Destrucción de las fuentes alimenticias de las especies superiores.
- Incorporación de carcinógenos en la cadena alimentaria.

Efectos fóticos

- La disminución de la entrada de luz en el mar a causa de manchas de petróleo reduce el área donde es posible la fotosíntesis y, por tanto el desarrollo de plantas verdes.
- La disminución de plantas fotosintéticas disminuye el aporte de oxígeno y alimento al ecosistema.
- La disminución de extensión en la distribución de algas limita las zonas que proporcionan seguridad a miles de especies marinas.

Efectos tóxicos

- Las aves quedan impregnadas de petróleo pierden su capacidad de protegerse del agua pudiendo morir por hipotermia. Y al intentar limpiarse con el pico ingieren grandes cantidades de hidrocarburos lo que les causa envenenamiento.
- Muerte de los organismos por envenenamiento, por contacto.
- Muerte por contacto a los componentes tóxicos del petróleo en el agua.
- Los mamíferos marinos sufren problemas en sus vías respiratorias o daños en el tracto respiratorio.
- El petróleo se deposita sobre los fondos marinos matando o provocando efectos subletales sobre miles de animales y plantas vitales para el ecosistema.
- Las algas quedan con una fina capa aceitosa que dificulta la fotosíntesis y la reproducción.
- Los efectos sub-letales sobre los animales marinos pueden ser: deformaciones, pérdida de fertilidad, reducción del nivel de eclosión de huevos, alteraciones en su comportamiento y gran cantidad de efectos derivados de la toxicidad del vertido.

Efectos del petróleo sobre la salud humana

El petróleo o sus componentes pueden entrar en contacto con el cuerpo humano a través de tres rutas:

- la absorción por la piel
- la ingestión de comida y bebida
- la inhalación a través de la respiración.

Cuando los hidrocarburos contaminan el medio ambiente, sus componentes se depositan en sedimentos que pueden contaminar lugares donde hay agua o pueden ser consumidos por organismos que entran en la cadena alimenticia del humano. Los componentes más ligeros se evaporan y se depositan a gran distancia de su lugar de producción a través del aire o del agua²⁷.

Los hidrocarburos del petróleo de mayor interés toxicológico son los compuestos volátiles orgánicos (principalmente benceno, tolueno y xileno) y los hidrocarburos aromáticos polinucleares (HAP). Los efectos que se presentan en el hombre son principalmente transitorios y de corta duración a menos que las concentraciones de los compuestos sean inusualmente altas.

Las exposiciones pueden irritar la piel, causando comezón o irritación de los ojos ante un contacto accidental o por la exposición a sus vapores, y pueden producir náusea, vértigo, dolores de cabeza o mareos en una exposición prolongada o repetida a bajas concentraciones de sus compuestos volátiles²⁸. La inhalación de aceites minerales puede causar una neumonía lipoidea y la muerte²⁹.

La exposición de mayor preocupación es al benceno, tolueno y xileno. Las concentraciones altas de benceno causan síntomas neurotóxicos y puede causar lesión de la médula ósea con pancitopenia persistente³⁰. El benceno en altas concentraciones causa leucemia. Al igual que en el caso de otras mareas negras, los estudios muestran que pueden causar síntomas neurovegetativos, irritativos de piel y mucosas y respiratorios³¹.

2.3. BIORREMEDIACIÓN

2.3.1. Generalidades:

La Biorremediación surge a mediados del siglo XX como una rama de la Biotecnología, con algunas investigaciones para estudiar el potencial de los microorganismos para biodegradar contaminantes de compañías petrolíferas; la

Biotecnología se caracteriza por el uso de organismos vivos o partes de estos para producir o modificar productos, mejorar plantas y/o animales; o para la creación de nuevos microorganismos para usos específicos que sean de necesaria utilidad⁵⁸.

La Biorremediación es un método biotecnológico que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos (principalmente bacterias, pero también hongos y levaduras) para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples poco o nada contaminantes, y, por tanto, se puede utilizar para limpiar terrenos o aguas contaminadas⁵⁹. Su ámbito de aplicabilidad es muy amplio, pudiendo considerarse como objeto cada uno de los estados de la materia; sólido (suelos o sedimentos), líquido (aguas superficiales, aguas subterráneas y aguas residuales) y gaseoso (emisiones industriales)⁶⁰.

También se puede realizar una clasificación en función de los contaminantes con los que se puede trabajar^{61, 62}:

- ✓ Hidrocarburos de todo tipo (alifáticos, aromáticos, TPH, BTEX, PAHs,...).
- ✓ Hidrocarburos clorados (PCBs, TCE, PCE, pesticidas, herbicidas,...).
- ✓ Compuestos nitroaromáticos (TNT y otros).
- ✓ Metales pesados: Estos no se metabolizan por los microorganismos de manera apreciable, pero pueden ser inmovilizados o precipitados.
- ✓ Otros contaminantes: Compuestos organofosforados, cianuros, fenoles, etc

El hombre usa la Biorremediación para destoxificar variados contaminantes en los diferentes ambientes como: mares, estuarios, lagos, ríos y suelos; usando de forma estratégica microorganismos, plantas o enzimas de estos. Esta técnica es utilizada para disminuir la contaminación por los hidrocarburos de petróleo y sus derivados, metales pesados e insecticidas; además se usa para el tratamiento de aguas domésticas e industriales, aguas procesadas y de consumo humano, aire y gases de desecho^{63,64}.

La actividad biológica de los microorganismos, altera la estructura molecular del contaminante y el grado de alteración determina si se ha producido biotransformación o mineralización. La biotransformación es la descomposición de un compuesto orgánico en otro similar no contaminante o menos tóxico, mientras que la mineralización es la descomposición a dióxido de carbono, agua y compuestos celulares⁶⁵.

La Biorremediación tiene ciertas ventajas respecto a los métodos físico-químicos (excavación, extracción química e incineración), ya sea por su bajo costo económico²⁵, como por la no afectación de otros compartimentos ambientales y la optimización de los recursos⁶⁶.

2.3.2. Factores para la Biodegradación de Hidrocarburos en el suelo

En el medio ambiente se encuentra gran cantidad de población microbiana potencialmente activa, las cuales llevan a cabo el proceso de biodegradación de los diferentes compuestos orgánicos que se encuentran en nuestro ecosistema; para llevar a cabo este proceso es necesario la presencia de nutrientes (C, N y P principalmente), también receptores de electrones, factores intrínsecos del contaminante como es la estructura molecular, concentración y biodisponibilidad, y factores ambientales como pH, temperatura y humedad; las cuales afectan la actividad metabólica⁶¹.

Tabla 7. Parámetros implicados en la Biorremediación⁶⁷

BIORREMEDIACIÓN	
Características del contaminante	<ul style="list-style-type: none"> - Composición - Propiedades - Toxicidad
Optimización microbiológica	<ul style="list-style-type: none"> - Nutrientes - Humedad - Aireación - Inóculo
Tecnología aplicada in situ vs ex situ combinaciones	<ul style="list-style-type: none"> - Land Treatment - Bioslurry - Compostaje - Bioventing
Métodos analíticos	<ul style="list-style-type: none"> - Adecuación - Control de calidad
Muestreo	<ul style="list-style-type: none"> - Estadística - Procedimientos
Regulación legal	<ul style="list-style-type: none"> - Valores de referencia - Análisis de riesgo - Permisos

La estructura química del contaminante condiciona su biodegradabilidad, de modo que cuanto mayor es el peso molecular de un compuesto y menos su solubilidad en agua más lentamente se degradará⁶⁸. De las diversas familias de hidrocarburos existentes, los n-alcenos y los alcanos ramificados de cadena intermedia (C₁₀ – C₂₀) son los sustratos más fácilmente degradables y los compuestos de cadena larga son difíciles de degradar⁶⁹.

Para realizar la biodegradación ambiental de los hidrocarburos, se requiere determinar la accesibilidad de los microorganismos al sustrato (biodisponibilidad)^{68,70}.

La biodisponibilidad es un factor crítico, que se caracteriza por ser un proceso dinámico, determinado por la tasa de transferencia de masa del sustrato a las células microbianas en relación a su actividad catabólica intrínseca⁷¹.

La capacidad metabólica de las poblaciones microbianas, frente a los contaminantes presentes en un suelo, es el fundamento sobre el que se sustenta la tecnología de la biorremediación⁶¹. Generalmente, en un suelo con contaminación recurrente o con episodios previos de contaminación, las poblaciones microbianas autóctonas se habrán seleccionado en favor de la metabolización del contaminante, el cual puede ser transformado con mayor rapidez que la materia orgánica húmica del suelo⁶⁹.

2.3.3. Tecnologías de biorremediación

El objetivo de la biorremediación es biodegradar o biotransformar los compuestos peligrosos que se encuentran contaminando el medio ambiente, utilizando microorganismos (bacterias heterótrofas y hongos), en sustancias menos dañinas como: CO₂, agua, sales inorgánicas y/o biomasa⁶¹.

Las técnicas de biorremediación se pueden clasificar en *in situ* y *ex situ*. En los tratamientos *ex situ* el suelo es excavado y transportado hasta la localización donde se aplicará la tecnología, mientras que en los *in situ* el suelo es tratado en su emplazamiento natural. Esto conlleva una serie de ventajas como un mayor abanico de tecnologías disponibles, mejor control sobre el proceso y su evolución junto con una mayor velocidad y homogeneidad, que hacen preferibles los tratamientos *in situ* en muchos casos.

En cambio, el proceso de excavación y transporte conlleva mayores costes, pero las tecnologías asociadas pueden ser más efectivas en relación a contaminantes de elevada persistencia en el ambiente⁶².

Tabla 8. Tratamientos de biorremediación⁷².

Tratamiento	Descripción	Aplicaciones	Ventajas
Bioestimulación	Adición de oxígeno agua y nutrientes	Agua superficial, manto freático y suelo.	Ayuda a acelerar el crecimiento de las bacterias presentes
Bioaumentación	Aplicación directa de microorganismos previamente aislados o modificados genéticamente	Agua superficial, manto freático y suelo.	Se considera una de las técnicas más efectivas. Las bacterias adaptadas se pueden aplicar para remediar químicos específicos en condiciones ambientales específicas.
Surfactantes	Aplicación de surfactantes sintéticos o biológicos utilizados para disminuir la tensión superficial e incrementar la solubilidad de los hidrocarburos	Para alifáticos sólidos y líquidos e hidrocarburos aromáticos	Permiten que los hidrocarburos estén disponibles para las bacterias
Aplicación de Fertilizantes	Estimula el metabolismo microbiano al modificar la relación C:N:P	Sedimentos y mantos acuíferos entre otros	Incrementa la actividad bacteriana en zonas deficientes de nutrientes

2.3.3.1. In Situ:

Los tratamientos *in situ* más comunes incluyen el bioventeo, la bioaumentación, la biolabranza, la atenuación natural y la fitorremediación⁷³.

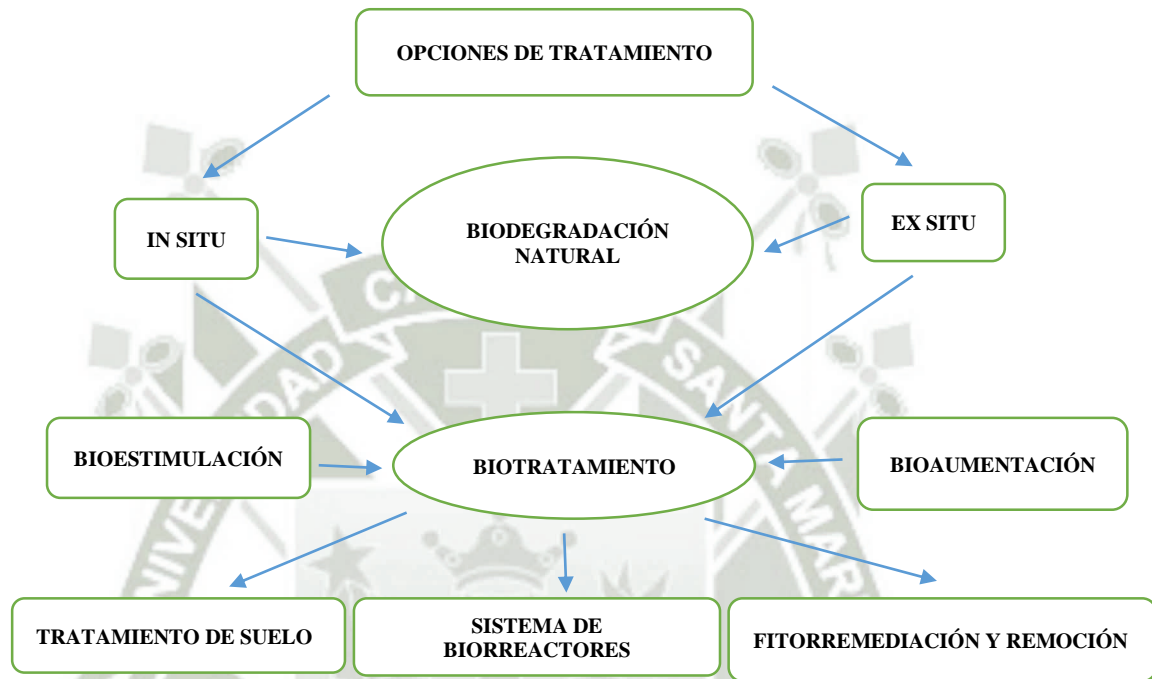


Figura 5. Opciones de Tratamiento

✓ Bioventeo

Su objetivo es estimular la biodegradación natural de cualquier compuesto biodegradable en condiciones aerobias. Se suministra el aire en el sitio contaminado por movimiento forzado (extracción o inyección), con bajas velocidades de flujo, con el fin de proveer solamente el oxígeno necesario para sostener la actividad de los microorganismos degradadores⁷³.

El bioventeo es usado para tratar COSs o no volátiles biodegradables, pueden degradarse COVs como vapores, por medio de su movimiento a través del suelo biológicamente activo⁶². Se ha utilizado exitosamente para remediar suelos contaminados con HTPs, solventes no clorados, pesticidas, conservadores de la madera y algunos otros químicos⁷³.

Limitaciones: Según Eweis y col., 1998, existen algunos factores que pueden limitar la aplicación de esta tecnología como :

- El tipo y concentración del contaminante
- Falta de nutrientes en la superficie
- Bajo contenido de humedad
- Dificultad para alcanzar el flujo de aire necesario

Costo y tiempo de remediación: Es una tecnología de mediano a largo plazo, los costos de operación se encuentra entre 10 y 70 USD/m³, ya que no requiere de equipo caro, pero los costos pueden verse afectados por la permeabilidad del suelo, además del espacio, número de pozos y velocidad de bombeo requeridos⁷³.

✓ **Bioaumentación**

Consiste en la adición de microorganismos vivos, capaces de degradar el contaminante problema, para generar la biodegradación o biotransformación; la concentración de inóculo a usar depende del tamaño de la zona contaminada la cual será tratada, de su dispersión y de la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores⁷⁴.

Generalmente se cultivan por separado en condiciones definidas, para realizar una tarea específica de remediación en un ambiente dado (in situ o en un biorreactor)⁷⁵. Esta tecnología se ha usado para tratar suelos

contaminados con herbicidas, insecticidas, clorofenoles y nitrofenoles, bifenilos policlorados, HTPs y HAPs⁶¹, se ha usado para tratar desechos con concentraciones altas de metales⁶².

Con el tiempo se han desarrollado dos enfoques distintos para llevar a cabo la bioaumentación; el primero se basa en inocular microorganismos con un potencial catabólico deseado, ya sea para complementar o sustituir la población microbiana nativa, en este caso se producirá una competencia por sobrevivir entre los microorganismos nativos y consorcios seleccionados, las cuales ocupan un nicho metabólico específico dentro de ambiente contaminado⁷⁶.

Y el segundo enfoque consiste en la adición de gran concentración de células que actúan en el momento como biocatalizadores y que biodegradan significativamente el contaminante problema, antes de que estas se vuelvan inactivas; en este caso los microorganismos inoculados no pueden establecerse por que existe un estrés abiótico y biológico que se encuentra en el nuevo entorno⁷⁷.

Los inoculos más utilizados para la bioaumentación incluyen^{78,79}:

- Cultivos mixtos
- Cultivos puros
- Elementos genéticos
- Microorganismo Genéticamente Modificados(OGM)

Limitaciones: Para ello es necesario realizar cultivos de enriquecimiento, aislar microorganismos con capacidad cometabolizadora o que sean capaces

de utilizar contaminantes como fuente de Carbono, y cultivarlos para obtener grandes cantidades de biomasa^{17,61}.

Tabla 9. Factores que influyen en los procesos de bioaumentación^{67,76}.

Factores	Descripción	Referencias
Pérdida de Viabilidad microbiana durante la inoculación	Estrés debido a los cambios drásticos en condiciones medioambientales.	VanVeen et al. (1997), goldstein et al. (1985)
Eventual muerte celular después de la inoculación	Agotamiento de los nutrientes o toxicidad causada por contaminantes.	Goldstein et al. (1985), Liu et al. (2009)
Competencia	Competencia por nutrientes con microorganismos nativos	Thompson et al. (2005), El Fantroussi y Agathos (2005)
Predación	Bioaumentación seguida por la desaparición de la población bacteriana y el crecimiento excesivo de protozoos.	Bouchez et al. (2000)
pH	pH extremos inhiben los procesos de la degradación microbiana.	Dibble t Bartha (1979)
Temperatura	Influye en el crecimiento y la potencial degradativa microbiana, así como la naturaleza física y química.	Atlas(1981)
Humedad	La baja humedad limita el crecimiento microbiano y su metabolismo, los valores más altos reducen la aireación del suelo.	Dibble and Bartha (1979), Leahy and Colwell (1990)

Costo y tiempo de remediación: Tecnología de mediana a largo plazo y no implica mucho capital ni costos de operación.

✓ **Bioestimulación**

Consiste en la estimulación de las poblaciones microbianas nativas mediante la adición de nutrientes, modificando su entorno; esto implica el tratamiento con soluciones acuosas (nutrientes y/u oxígeno) a través del suelo contaminado, incrementando la actividad microbiana y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos hasta su transformación a productos inócuos³⁷.

Típicamente implica la inyección de agua con nutrientes y saturada con O₂ disuelto, también se puede agregar microorganismos adaptados (Bioaumentación) y una fuente adicional de oxígeno (O₂)⁷³. Esta técnica se ha usado para remediar suelos contaminados con gasolina, COVs y COSs, y pesticidas^{17,61}.

Limitaciones: Esta tecnología no es muy eficaz para suelos arcillosos, altamente estratificados o demasiado heterogéneos, ya que existe limitaciones en la transferencia de O₂. También es un método conocido y efectivo para tratar aguas y subsuelo que han sido contaminados con hidrocarburos. Existen algunos factores que limitan esta aplicación:

- El tipo de suelo no favorezca el crecimiento microbiano
- Incremento de la movilidad de los contaminantes por circulación de agua
- Obstrucción en los pozos de inyección provocada por el crecimiento microbiano.

Costo y tiempo de remediación: Tecnología a largo plazo, su costo oscila entre 30 y 100 USD/ m³. La naturaleza y profundidad de los contaminantes y el uso de bioaumentación puede aumentar sus costos⁷³.

✓ **Atenuación natural**

Esta es una tecnología natural que permite reducir la concentración de contaminantes sin alterar las condiciones del suelo, describe un rango de procesos fisicoquímicos y biológicos, reduce la concentración, toxicidad o movilidad de los contaminantes⁷³. Mediante esta técnica es favorable la remoción de contaminantes orgánicos, sin embargo los HAP se consideran persistentes, y se vuelven difíciles de degradar.

La atenuación natural es la reducción de las concentraciones elevadas del contaminante en el ecosistema mediante los procesos biológicos, los fenómenos físicos (advección, dispersión, dilución, difusión, volatilización, sorción/desorción) y las reacciones químicas (intercambio iónico, complejación, transformación abiótica). Mediante esta tecnología se puede tratar contaminantes como: solventes volátiles (incluyendo BPCs), HTPs, metales y explosivos así como también gasolinas y algunos solventes clorados, son los compuestos más comúnmente evaluados por atenuación natural⁷³.

Limitaciones: Si los factores específicos del lugar permiten mantener el uso de esta, es posible aplicar esta tecnología, estos factores incluyen: condiciones geológicas y geoquímicas favorables, tiempos razonables de biodegradación y presencia de microorganismos degradadores, también es necesario la caracterización del sitio, con un monitoreo a largo plazo⁸⁰.

Costo y tiempo de remediación: Implica costos adicionales por el modelamiento para la predicción de velocidades de degradación, así como para contenedores, muestreo y análisis para determinar el grado de contaminación y confirmar su degradación y el estado de limpieza⁸⁰.

✓ **Fitorremediación**

Esta tecnología es asociada con el uso potencial de especies hiperacumuladoras, y se caracteriza por que utiliza diferentes tipos de plantas para transferir, remover, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes tóxicos ya sean orgánicos e inorgánicos que se encuentran en suelos, agua y sedimentos. Existen mecanismos de fitorremediación en donde las plantas incorporan sustancias contaminantes mediante diferentes procesos; fitoextracción, rizofiltración, fitoestabilización, fitoestimulación, fitovolatilización y fitodegradación⁷³.

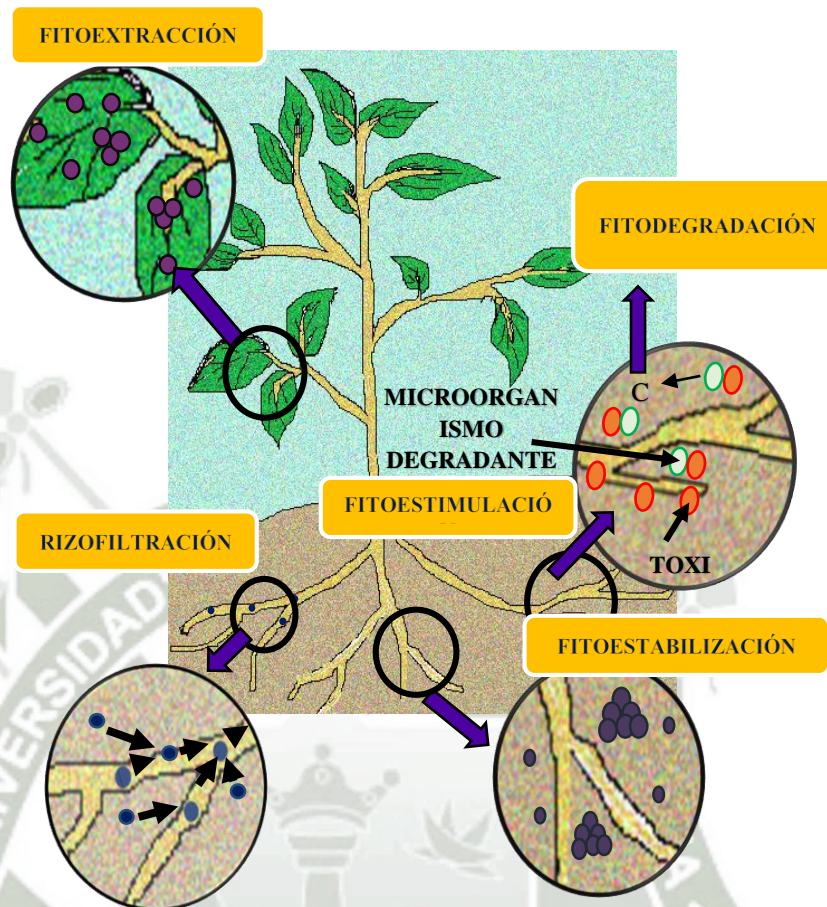


Figura 6. Zonas de la planta en donde ocurre cada proceso⁸¹.

Tipos de Fitorremediación:

Tabla 10. Tipo de Fitorremediación⁸¹.

TIPO	PROCESO INVOLUCRADO	CONTAMINACIÓN
Fitoextracción	Las plantas se usan para concentrar metales en las partes cosechables (hojas y raíces)	Cadmio, cobalto, cromo, níquel, mercurio, plomo, plomo selenio, zinc

Rizofiltración	Las raíces de las plantas se usan para absorber, precipitar y concentrar metales pesados a partir de efluentes líquidos contaminados y degradar compuestos orgánicos	Cadmio, cobalto, cromo, níquel, mercurio, plomo, plomo selenio, zinc isótopos radioactivos, compuestos fenólicos
Fitoestabilización	Las plantas tolerantes a metales se usan para reducir la movilidad de los mismos y evitar el pasaje a napas subterráneas o al aire.	Lagunas de deshecho de yacimientos mineros. Propuesto para fenólicos y compuestos clorados.
Fitoestimulación	Se usan los exudados radiculares para promover el desarrollo de microorganismos degradativos (bacterias y hongos)	Hidrocarburos derivados del petróleo y poliaromáticos, benceno, tolueno, atrazina, etc.
Fitovolatilización	Las plantas captan y modifican metales pesados o compuestos orgánicos y los liberan a la atmósfera con la transpiración.	Mercurio, selenio y solventes clorados (tetraclorometano y triclorometano).
Fitodegradación	Las plantas acuáticas y terrestres captan, almacenan y degradan compuestos orgánicos para dar subproductos menos tóxicos o no tóxicos.	Municiones (TNT, DNT, RDX, nitrobenzono, nitrotolueno), atrazina, solventes clorados, DDT, pesticidas fosfatados, fenoles y nitrilos, etc.

La fitorremediación puede aplicarse con éxito para tratar suelos contaminados con compuestos orgánicos e inorgánicos, como benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX); solventes clorados, HAPs; desechos de nitrobenzono; pesticidas clorados e insecticidas órgano – fosfatados; además metales⁸².

Limitaciones: Existen diferentes limitaciones para su uso:

- El tipo de plantas utilizadas determina la profundidad de la zona a tratar
- Altas concentraciones de contaminantes pueden ser tóxicas para las plantas
- Puede depender de la estación del año
- No es efectiva para tratar contaminantes fuertemente sorbidos
- La toxicidad y biodisponibilidad de los productos de la degradación no siempre se conocen y pueden movilizarse o bioacumularse en animales.

Costo y tiempo de remediación: Se estima grandes cantidades de dinero, por ejemplo si un suelo contaminado con Pb (50 cm de profundidad) puede costar entre 24,000 y 40,000 USD/Hectárea⁷³.

2.3.3.2.Ex situ:

Por otro lado, los tratamientos ex situ se pueden clasificar según si se implementan en la zona contaminada (on site) o en un emplazamiento adyacente (off site). Los más comunes son:

✓ **Landfarming**

Es una tecnología de remediación de suelos contaminados, el cual consiste en retirar el suelo contaminado a otro terreno acondicionado, para poder reducir así las concentraciones de hidrocarburos de petróleo, mediante el uso de microorganismos para su posterior biodegradación, ya que estos microorganismos tienen la facultad de degradar sustancias orgánicas al aprovecharlas como fuente de energía.

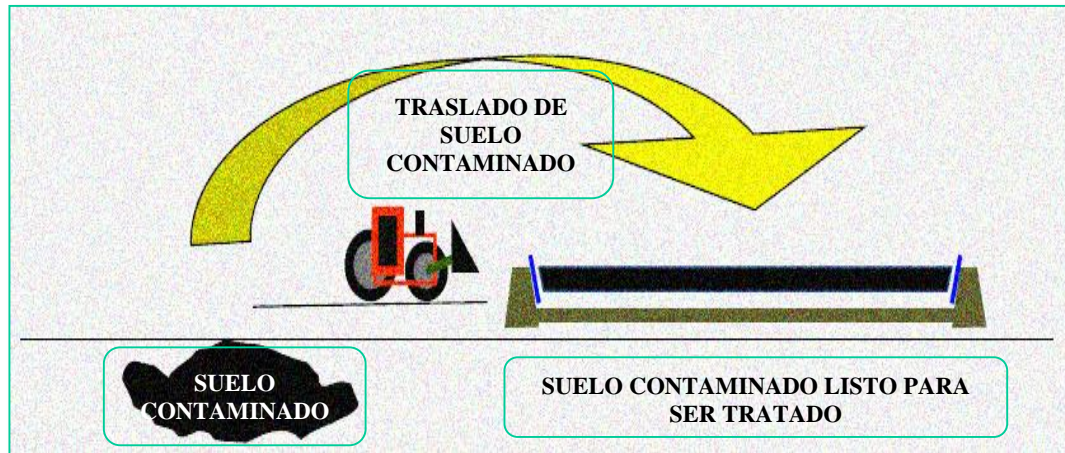


Figura 7. Proceso de acondicionamiento del suelo contaminado⁸³.

Esta tecnología permite el buen control del proceso de biodegradación de los contaminantes, mediante la construcción de una celda en el cual se coloca el material contaminado; con ayuda de un sistema de riego y el uso de productos que sirven para acelerar el ciclo de vida de los microorganismos; por lo tanto la biodegradación de los contaminantes se dará en un período de tiempo menor.

Los contaminantes se degradan, transforman y se inmovilizan por medio de reacciones bióticas y abióticas⁸³.

Los contaminantes que pueden ser tratados por esta tecnología son algunos residuos provenientes de industrias lácteas, frigoríficas, alimentos en general; residuos de industrias petroleras, químicas y farmacéuticas; barros y fondos de tanques de combustibles e hidrocarburos en general y suelos contaminados por derrames de hidrocarburos⁸⁴.

Esta tecnología es muy simple y de bajo costo, requiere gran espacio, y la reducción en las concentraciones de contaminantes puede ser a veces debida a la volatilización en lugar de la biodegradación^{85,86}.

✓ Biorreactores en “slurry”

Los biorreactores pueden usarse para tratar suelos heterogéneos y poco permeables, o cuando es necesario disminuir el tiempo de tratamiento, porque es posible combinar, controlada y eficientemente, procesos químicos, físicos y biológicos, que mejoren y aceleren la biodegradación⁵⁸.

Una de las tecnologías más utilizadas para biorremediar suelos contaminados es el biorreactor de lodos, en el cuál el suelo contaminado se mezcla constantemente con un líquido, y la degradación se lleva a cabo en la fase acuosa por microorganismos en suspensión o inmovilizados en la fase sólida. El tratamiento puede realizarse también en lagunas construidas para este fin o bien en reactores sofisticados con control automático de mezclado^{17,61}.

Los biorreactores de lodos aerobios, se utilizan principalmente para tratar HTP, COS no halogenados y COVs. Se utilizan también reactores secuenciales de lodos aerobios/anaerobios para tratar BPC, COS halogenados, pesticidas y desechos de artillería⁷³.

Limitaciones: Algunos factores que pueden limitar el uso y efectividad de los biorreactores son:

- el suelo debe tamizarse;
- suelos heterogéneos y arcillosos pueden generar problemas de manipulación;
- los productos intermediarios pueden ser más tóxicos que el contaminante original (en caso de explosivos o solventes clorados);
- los residuos pueden requerir de tratamiento o disposición final^{73,74}.

Costos y tiempos de remediación: Los biorreactores de lodos pueden clasificarse como una tecnología de corto a mediano plazo. El uso de biorreactores de lodos oscila entre 130 y 200 USD/m³.

✓ **Micorremediación**

Es una tecnología de remediación en desarrollo, en donde se utilizan hongos de pudrición blanca de la madera para degradar una variedad de contaminantes orgánicos, existen pruebas que demuestran la capacidad de estos hongos para mineralizar una gran cantidad de contaminantes, por acción de sistemas enzimáticos, como la peroxidasa extracelular (lignina y manganeso peroxidada) y lacasa^{73,87}.

Según Reddy, 1995; existen razones para considerar el empleo de estos hongos para la biorremediación de suelos, como los siguientes:

- Son capaces de mineralizar una serie de compuestos tóxicos.
- Son habitantes comunes en ambientes naturales
- Tienen potencial para oxidar sustratos poco solubles
- Sus enzimas se expresan bajo condiciones nutricionales deficientes, presentes en muchos suelos.

Se ha demostrado que la *Phanerochaete chrysosporium* y otros hongos de pudrición blanca, para degradar y mineralizar HAPs, BPCs, clorofenoles, además algunos pesticidas y herbicidas⁸⁷.

Limitaciones: Existen algunos factores que limitan el uso de hongos⁷³:

- Elevadas concentraciones de contaminantes.
- Dificultad para alcanzar niveles de limpieza aceptables
- Competencia con poblaciones bacterianas nativas
- Biobisponibilidad de contaminantes.

Costos: Los costos son de orden 100 USD/m³, las aplicaciones comerciales son limitadas.

✓ **Biopila**

Esta tecnología consiste en la formación de pilas con el suelo a tratar y la adición de nutrientes e inyección de aire. Estas biopilas usualmente poseen un tamaño de 2 a 4 metros de altura⁸⁵ y también pueden llegar a tener un tamaño que va desde metros cúbicos a escala piloto hasta 1000 m³ a escala real⁸⁹. Esta tecnología ha sido utilizada a gran escala especialmente para hidrocarburos del petróleo^{90,91}, y HAPs de origen piloto como los residuos del carbón y la cresota⁹².

Con esta tecnología se puede destruir varios compuestos peligrosos incluyendo algunos que resisten otras formas de tratamiento.

Las biopilas permiten el tratamiento de tierras contaminadas ex situ, mediante la estimulación de la degradación biológica de compuestos orgánicos. El tratamiento microbiológico es más caro que técnicas tales como extracción de vapor del suelo (SVE), pero más barato que los tratamientos ex situ (incineración en plantas de tratamiento y disposición final) y más rápido que otros métodos de remediación. La tierra contaminada se mezcla con nutrientes y oxígeno para dar inicio a la actividad biológica de los microorganismos endógenos y consumir el carbono de los contaminantes, en algunos casos es necesario la inoculación con cultivo seleccionado y especializado para acelerar la degradación⁸⁸.

Esta tecnología consiste en la formación de pilas de material biodegradable de medidas variables, formadas por suelo contaminado y materia orgánica (compost) en condiciones favorables para el desarrollo de los procesos de biodegradación de los contaminantes. Estas pilas de compost pueden ser

aireadas de forma activa, volteando la pila, o bien de forma pasiva, mediante tubos perforados de aireación.

Las biopilas se pueden aplicar a la mayoría de los compuestos orgánicos, siendo más eficaz en los compuestos de carácter más ligero. Entre los factores que influyen en la aplicación de las biopilas destacan⁸⁸:

- Los hidrocarburos deben ser no halogenados y deben encontrarse en el suelo en concentraciones menores a 50.000 ppm., superficie de trabajo relativamente grande, necesidad de una población microbiana mayor a 1000UFC (Unidades Formadoras de Colonias) por gramo de suelo.
- Dada la necesidad de excavación y posterior depósito del suelo contaminado, se requiere una superficie de trabajo relativamente grande cuyas dimensiones dependen del volumen de suelo a tratar.
- Necesidad de una densidad de poblaciones microbianas (>1.000 CFU/gramo de suelo), condiciones de humedad (40-85% de capacidad de campo), temperatura (10 y 45°C), textura (baja proporción de arcillas), pH del suelo adecuadas (6 y 8) y baja presencia de metales pesados (< 2.500 ppm).
- La concentración de nutrientes en el suelo cuyo rango normal de C: N: P sea de 100:10:1.
- El tiempo de actuación puede ser alto (meses a años) y el costo bajo.

Esta tecnología se aplica para la eliminación de compuestos orgánicos biodegradables adsorbidos en un suelo excavado, y también para la eliminación de: gasolinas, fuel- oil, gasoil, HAPs, benceno, tolueno etilbenceno y xileno, aceite minerales; y también en algunos casos para algunos compuestos orgánicos halogenados y pesticidas. Las pilas de suelo generalmente se cubren con plásticos para controlar los lixivados, la

evaporación y la volatilización de contaminantes, además de favorecer su calentamiento⁶².

Limitaciones: Pueden dificultar la viabilidad del tratamiento con esta tecnología, la granulometría de las tierras y el contenido de materia orgánica, otras deficiencias pueden suplirse mediante la aportación de nutrientes y materia estructurante, aunque estas deficiencias aumenta con los costos y el volumen de material a tratar.

Las biopilas se utilizan cuando la sustancia contaminante es demasiado volátil como para ser tratada con la metodología de Landfarming (ya que las emisiones gaseosas serían elevadas), o cuando se quiere acelerar el proceso de remediación (esta tecnología utiliza tiempos más cortos de remediación).

Costos y tiempo de remediación: Las biopilas son tratamientos de operación sencilla y costo reducido, se dispone de un tiempo adecuado, puede ser de meses a años; la disminución de la concentración de los contaminates permite que las tierras puedan ser reutilizadas o gestionadas como residuo inerte.

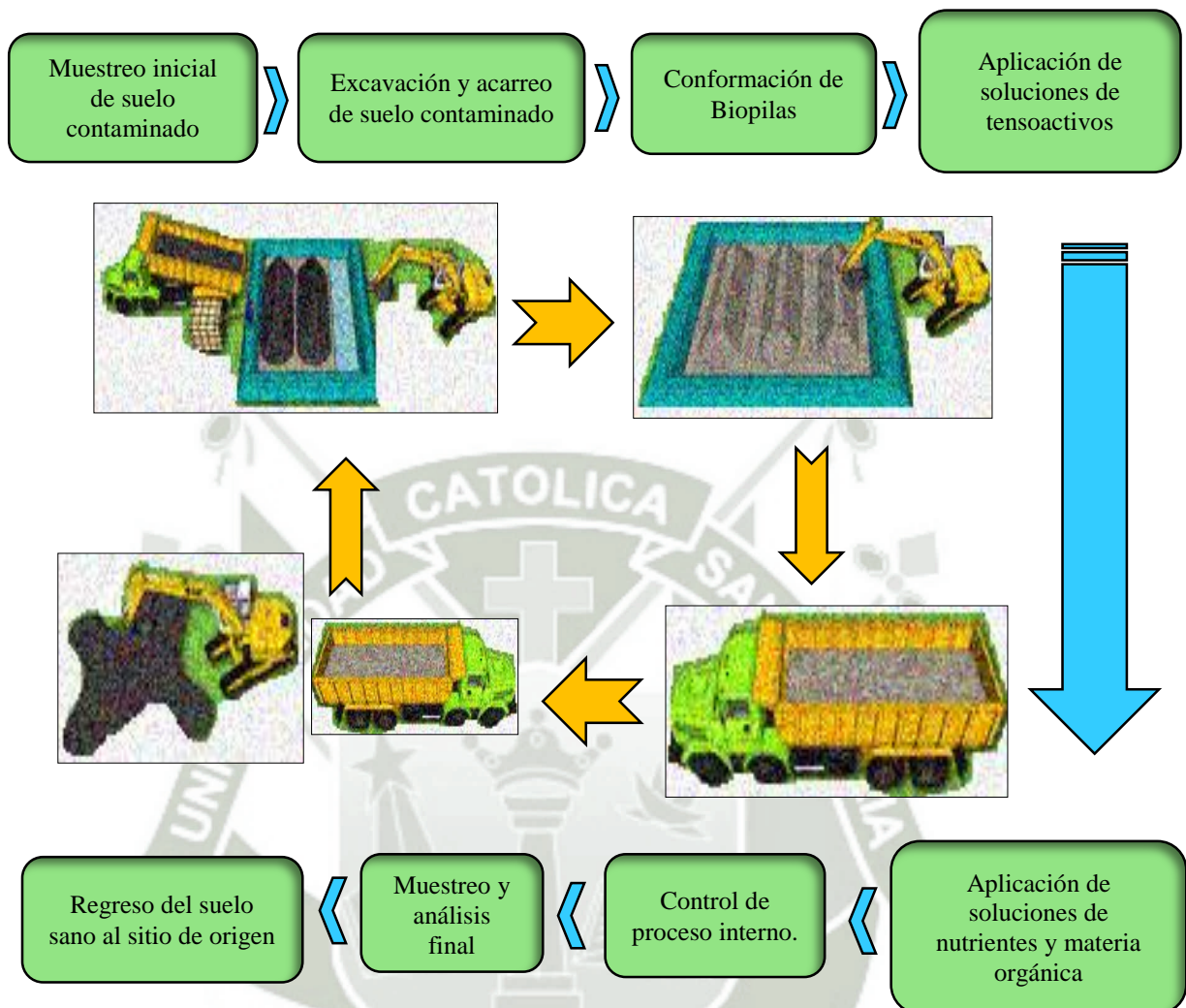


Figura 8. Proceso de Biorremediación por biopila⁸⁸.

2.4.MICROORGANISMOS EN LA BIORREMEDIACIÓN

Durante mucho tiempo se viene estudiando a diferentes microorganismos con el fin de utilizarlas como bio - herramientas para crear, mejorar, o innovar algo nuevo o potenciar propiedades de distintos productos existentes en el mercado con el único propósito de reutilizar lo que tenemos alrededor, y evitar la contaminación medioambiental, es por ello que distintos microorganismos son de gran importancia.

Existen microorganismos que tienen distintas propiedades y que aún siguen en estudio; una serie de investigaciones demuestran el uso de bacterias con propiedades de acumular o metabolizar metales pesados, y que también transforman diferentes compuestos nocivos en otros de menor impacto ambiental.

En la actualidad se vienen usando bacterias para la biorremediación, pero también existen otros microorganismos como hongos, algas, cianobacterias y actinomicetos; las cuales degradan distintos compuestos tóxicos en el suelo.

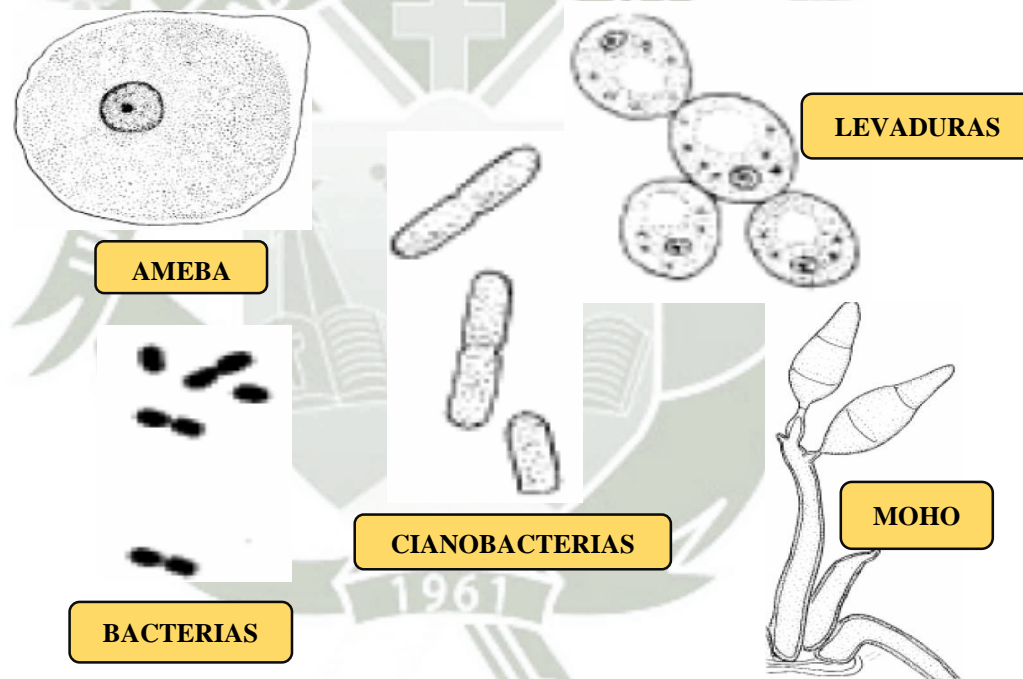


Figura 9. Tamaño comparativo de algunos microorganismos³².

Los diferentes microorganismos existentes en nuestro medio ambiente, desempeñan funciones de gran importancia en relación con procesos de edafogénesis; ciclos biogeoquímicos de elementos como el carbono, el nitrógeno, oxígeno, el azufre, el

fósforo, el hierro y otros metales; fertilidad de las plantas y protección frente a patógenos; degradación de compuestos xenobióticos, etc.

En un suelo agrícola están presentes alrededor de 10^{10} organismos por gramo de suelo y constituyen una biomasa de aproximadamente 1500 Kg por Ha. Un gramo de suelo fértil puede contener 10^8 células bacterianas, 10^6 esporos de actinomicetos³².

2.4.1. Bacterias

La biorremediación acelera procesos biodegradativos que de forma natural ocurren en ecosistemas contaminados, donde las comunidades microbianas suelen ser dominadas por microorganismos adaptados, capaces de utilizar compuestos tóxicos del espacio contaminado. En ambientes contaminados por hidrocarburos es frecuente que bacterias Gram negativas dominen el sistema³³.

Si los contaminantes son sintéticos y nuevos en el medio ambiente, los microorganismos no tienen la capacidad de degradarlos, ya que los genes biodegradativos no han evolucionado. Incluso si los genes están presentes, la expresión funcional de los genes es esencial para que las enzimas degradativas apropiadas puedan ser producidas³⁴. También existen algunas bacterias marinas que poseen capacidad de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono y son la mejor opción en los derrames de petróleo en zonas costeras³⁵. La biodegradación natural por parte de las bacterias nativas puede ser estimulada por el agregado de fertilizantes y oxígeno³⁶.

Estos organismos son un grupo diverso con variaciones extensivas respecto a sus propiedades morfológicas, ecológicas y fisiológicas ya que son principales degradadores de compuestos orgánicos naturales y xenobióticos encontrados en el medio ambiente; los más comunes son: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*,

Achromobacter, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* y *Flavabacterium*. Los suelos contaminados con diferentes compuestos orgánicos contienen una gran cantidad y variedad de microorganismos, que aproximadamente representan 10^4 o 10^6 células por gramo de suelo. Diferentes investigaciones han demostrado que las bacterias de la clase *Pseudomona* son los más encontrados en los suelos contaminados, dentro de las especies de esta bacteria tenemos: *Aeruginosa*, *Cepacia*, *Putida*, la *Stutzeri* entre otros³⁷.

Las bacterias tienen tres apariencias físicas generales como; Esféricas (cocos), forma de bastones (bacilos) y forma de espiras (espirilos), y se clasifican usando sus características físicas, químicas, genéticas y metabólicas.

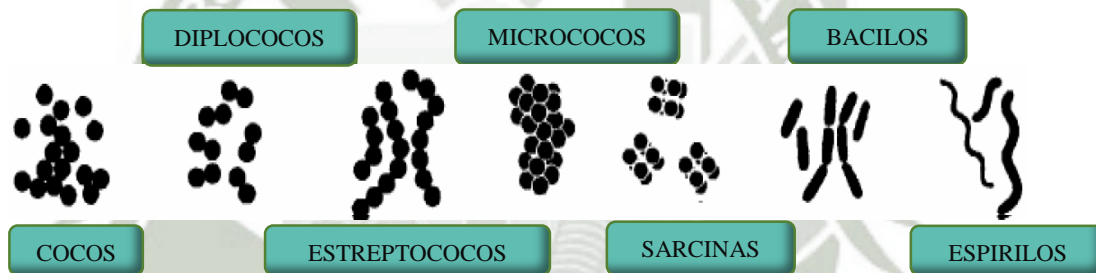


Figura 10. Apariencias físicas generales de las bacterias³⁸.

Las bacterias también se pueden clasificar como eutrofas, las cuales crecen en presencia de altas concentraciones de sustratos, y oligotrofas, las cuales crecen con concentraciones trazas.

También existen algunas bacterias capaces de formar esporas, cuando se encuentran en condiciones adversas (suelos secos o falta de nutrientes), sus esporas son resistentes al calor y son difíciles de destruir, las bacterias formadas de esporas son muy comunes en suelos donde las condiciones pueden ser muy variables.

Tabla 11. Variedad de Bacterias usadas en los procesos de Biorremediación³⁹.

BACTERIAS	GÉNERO	IMPORTANCIA AMBIENTAL
Bacterias de Descomposición	Pseudomona	Degrada compuestos orgánicos
	Flavobacterium	Degrada proteína
	Zooglea	Organismo formador de flóculos en plantas de lodos activados
	Clostridium	Producen ácidos grasos a partir de materia orgánica en un digestor anaerobio
	Micrococcus	
	Methanobacterium	Producen metano gaseoso a partir de ácidos grasos en un digestor anaerobio.
	Methanococcus	
Methanosarcina		
Bacterias Nitrificantes	Nitrobacter	Oxidan compuestos Nitrogenados inorgánicos
	Nitrosomonas	
Bacterias Desnitrificantes	Bacillus	Reducen nitratos y nitritos a nitrógenos gaseoso u óxido nítrico
	Pseudomonas	
Bacterias degradadoras de Cloro	Pseudomonas transgenicas	Degradan compuestos tóxicos (Vinilcloruro)
Bacterias fijadoras de Nitrógeno	Azobacter	Fijan el Nitrógeno atmosférico en NH ₃
	Beijerinckia	
Bacterias reductoras de sulfatos	Desulfovibrio	Interviene en la corrosión de tuberías de vidrio
Bacterias Fotosintéticas	Chlorobium	Reducen sulfuros a azufre elemental
	Chromatium	

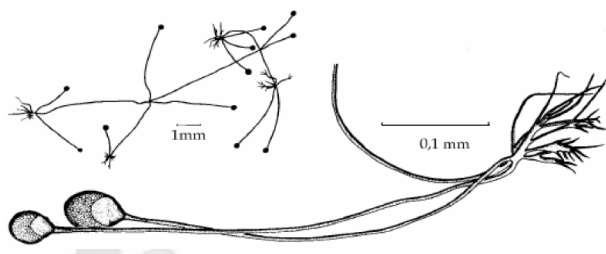
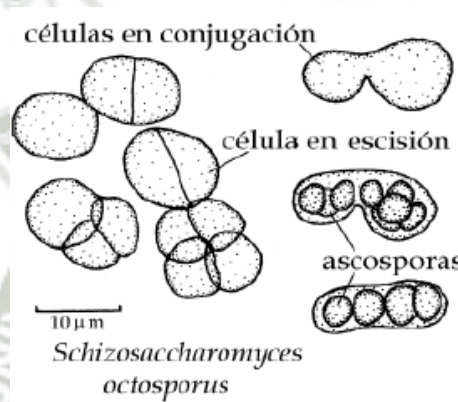
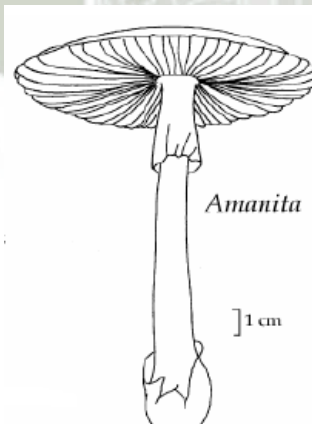
Bacterias Férricas	Sphaerotilus (Filamentosas)	Dan volumen a los lodos en las plantas de lodos activados
	Leptothrix (Oxidantes del hierro)	Oxidan el Hierro ferroso
Bacterias Degradadoras de hidrocarburos	Pseudomonas Arthrobacter Actinomyces Aerobacter Flaviobacterium Corynebacterium Micrococcus	Degradan hidrocarburos

Se sabe que algunas bacterias usan Hidrocarburos como fuente de Carbono para su crecimiento y solo algunos son capaces de degradar hidrocarburos gaseosos, y la otra parte es capaz de degradar hidrocarburos parafínicos.

2.4.2. Hongos

Los hongos son altamente protistas, emplean materia orgánica como fuente de Carbono y energía, estos no tienen movimiento; algunos de los que conocemos son los mohos, levaduras y setas.

Tabla 12. Aspectos de un Moho, Levadura y Seta³².

	ESPECIE	FUENTE
	Moho	Webster, 1986
 <p>células en conjugación</p> <p>célula en escisión</p> <p>ascosporas</p> <p>10 μm</p> <p><i>Schizosaccharomyces octosporus</i></p>	Levadura	Hawksworth et al., 1995; Webster, 1986)
 <p><i>Amanita</i></p> <p>]1 cm</p>	Seta	Hawksworth et al., 1995; Webster, 1986)

Se ha demostrado que los actinomicetos degradan Fenoles, aromáticos, esteroides, aromáticos clorados y lignocelulosas⁴⁰.

Los hongos un poco lentos en su crecimiento, en los procesos metabólicos son menos diversos y también suelen ser muy tolerantes a los ácidos, más que las bacterias.

El *Phanerochaete chrysosporium*, es un hongo de la podredumbre blanca, que tiene un potencial considerable durante el tratamiento de compuestos orgánicos peligrosos, produce una enzima extracelular llamada peroxidasa que degrada la lignina en presencia de peróxido, distintos estudios han revelado que este hongo degrada una alta variedad de compuestos altamente clorados y recalcitrantes.

2.5. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

2.5.1. Aislamiento de microorganismos:

Este procedimiento se hace con el objetivo de obtener cepas bacterianas puras, de un grupo de bacterias, para ello se emplea medios especiales de Sales Minerales Modificado.

Esto es llevado a cabo en Laboratorios de Microbiología, se hace la transferencia del microorganismo de un ambiente a otro que tenga lo necesario para su desarrollo, en este caso medios de cultivos generales y/o de selección que tienen compuestos inhibitorios e induciendo el crecimiento de bacterias que sean capaces de desarrollarse en ese medio, para su posterior identificación.

2.5.2. Caracterización de microorganismos

✓ **Macroscópica**

Es útil y necesario llevar a cabo este procedimiento, debido a que se ve a simple vista características, como: color, producción de algún tipo de pigmento, forma, tamaño, etc.

✓ **Microscópica**

- **Tinción Gram**

Es necesario hacer esta tinción ya que gracias a este procedimiento se puede saber si la bacteria con la que se está trabajando es Gram positiva o Gram negativa, ya que mediante estos resultados se puede ver, si presentan dos membranas lipídicas que se localizan y una fina pared celular de peptidoglicano o tan sólo presentan una sola membrana lipídica y la pared peptidoglicano es mucho más gruesa.

Se fija la muestra en el portaobjetos y se colorea con cristal violeta, se enjuaga con agua, luego se colorea con lugol y se enjuaga, para luego empapar con alcohol acetona que decolora para enjuagarlo después, finalmente con safranina como un colorante secundario, se enjuaga y se ve al microscopio.

Luego de realizar la tinción Gram se observa al microscopio con los diferentes aumentos (10X, 40X y 100X), este último con aceite de inmersión, se debe hacer la Tinción Gram para observar si la bacteria es Gram positiva o Gram negativa, también se puede ver la forma, tamaño, etc.

✓ **Pruebas bioquímicas**

Para saber bien, el tipo de bacteria que se tiene, se debe realizar estas pruebas bioquímicas, aquí se emplea diferentes medios, como: SIM, TSI, LIA, Urea, Citrato Simmons, MRVP, OF, Oxidasa y Catalasa; los resultados finales obtenidos mediante estas pruebas se compara con bibliografía y se identifica a la bacteria.

2.5.3. Identificación Molecular

Los métodos moleculares se han elegido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos. En la década de los 80, comenzó la

búsqueda de candidatos que, siendo genes estables, permitieran establecer relaciones filogenéticas entre las bacterias, como los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 16S, 23S y sus espacios intergénicos. En la taxonomía bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada. Este marcador housekeeping está presente en todas las bacterias. Se presenta como una familia de multigenes u operones cuya función no se modifica con el tiempo y actúa como un marcador eficiente de evolución. Además, tiene un tamaño adecuado para realizar el análisis. El ARNr 16S además de ser útil para la detección de bacterias, proporciona información útil y rápida sobre su identificación y filogenia mediante la comparación con bases de datos públicas que contienen un amplio número de secuencias bacterianas. Así pues, la identificación mediante el ARNr 16S se fundamenta en su secuencia.

2.6. METABOLISMO MICROBIANO DE HIDROCARBUROS

La biodegradación de hidrocarburos se ha descrito en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. El proceso degradativo en condiciones anaeróbicas es más lento y los mecanismos bioquímicos aún no han sido descritos en su totalidad⁴¹.

Mientras que las rutas aeróbicas para hidrocarburos alifáticos y HAPs de hasta tres anillos están bien caracterizados, las reacciones para la biodegradación de hidrocarburos están catalizadas por las enzimas oxigenasas, tanto en hongos como en bacterias, estas actúan incorporando átomos de oxígeno, que proviene del oxígeno molecular (O_2), al sustrato; mientras que las monooxigenasas incorporan un solo átomo de oxígeno y el otro es reducido a agua, por otro lado las dioxigenasas incorporan los dos átomos de oxígeno. Es por ellos, que se sobrentiende que los microorganismos degradadores de hidrocarburos requieren la presencia de oxígeno para llevar a cabo la oxidación inicial del sustrato y para el proceso final de la cadena respiratoria, donde su función es de aceptor final de electrones.

2.7. MECANISMO DE BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS

La mayoría de microorganismos utilizan los hidrocarburos como fuente de Carbono para su crecimiento, las cuales tienen un metabolismo respiratorio aerobio (la degradación en presencia de Oxígeno es más rápida y extensa), lo cual implica una degradación gradual de las moléculas para formar uno o más fragmentos capaces de ingresar en el metabolismo central (Figura 7). Recientes estudios demuestran la degradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos de bajo peso molecular en condiciones de anaerobiosis y en presencia de aceptores de electrones apropiados (NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2 , Fe^{3+} , algunas moléculas orgánicas)⁴². Como se verá en esta Tesis se ha centrado en la degradación de Hidrocarburos del petróleo por bacterias aisladas del suelo contaminado.

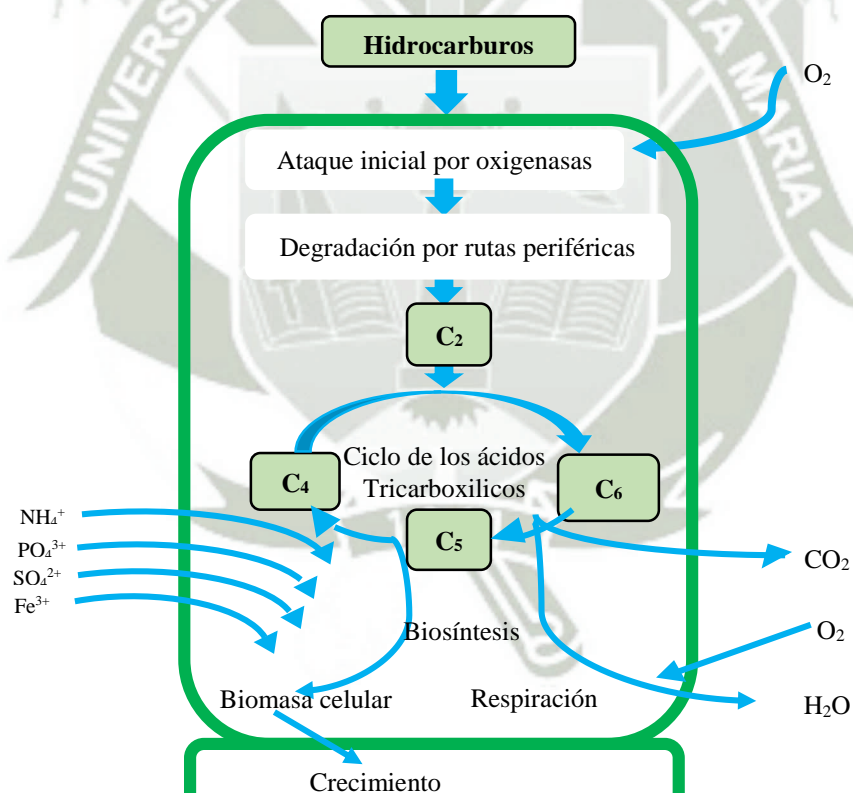


Figura 11. Principios de la degradación microbiana de los hidrocarburos⁴³.

En la célula microbiana ocurre lo siguiente:

- Lo primero que sucede es el contacto entre las células microbianas y los hidrocarburos. Los hidrocarburos tienen que ser accesibles para que sean biodegradados por los microorganismos.
- Luego, ocurre un proceso oxidativo, que es el ataque inicial al sustrato en el interior de la célula microbiana, este proceso es realizado por enzimas (oxigenasas y peroxidasas), que activan e incorporan oxígeno al contaminante.
- Después del proceso oxidativo, sigue la degradación por rutas periféricas, que paso a paso convierten los hidrocarburos en intermediarios del metabolismo central, como por ejemplo del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
- La biosíntesis de biomasa celular a partir de metabolitos precursores como acetil-CoA, succinato o piruvato. Los azúcares requeridos para los procesos biosintéticos y para el crecimiento son sintetizados por glucogénesis⁴³.

El uso total de hidrocarburos como única fuente de Carbono, conduce a una completa mineralización es decir; conversión de una parte de los elementos que los integra en productos inorgánicos como CO_2 o H_2O ; siempre y cuando las bacterias degradadoras contengan todas las enzimas necesarias para llevar a cabo el proceso. Pero muchas veces se produce metabolitos intermediarios que no son reconocidos como sustrato por las enzimas de la vía, y se da una degradación parcial; y cuando esta transformación no produce carbono para el crecimiento se habla de *cometabolismo*. Entonces se concluye que la degradación parcial y el cometabolismo son productos de la baja especificidad de algunas enzimas presentes en las rutas metabólicas de degradación. Para llevar a cabo el proceso de biodegradación se requieren diferentes enzimas, que incluyen oxidaciones catalizadas por oxigenasas (mono y dioxigenasas) y peroxidasas⁴³.

Las oxigenasas son oxido-reductoras que usan moléculas de O_2 , para poder introducir oxígeno en el contaminante para desestabilizarlo, mientras que las dioxigenasas incorporan dos átomos de oxígeno, y las monooxidasas incorporan solo uno, y el otro es

reducido a agua. Las peroxidasas son enzimas catalizadoras, que participan en la oxidación de un conjunto de sustratos orgánicos e inorgánicos, ya que usan su poder oxidante del peróxido de hidrógeno⁴³.

2.7.1. Biodegradación de Hidrocarburos Alifáticos

Dentro de los Hidrocarburos Alifáticos, se encuentra los *n*-alcanos, este grupo de hidrocarburos son los que con mayor facilidad se degradan³⁶. Los alcanos son moléculas altamente reducidas con un elevado contenido de Carbono y energía, por ende, constituyen un buen sustrato para bacterias, hongos filamentosos y levaduras^{44, 45}. Pero cabe destacar que este proceso no es nada sencillo, ya que estos compuestos son hidrófobos por ende su solubilidad en agua es extremadamente baja, lo cual es un problema para su absorción. Muchos degradadores de alcanos son bacterias con un metabolismo muy versátil, pero con el pasar del tiempo se han identificado distintas especies bacterianas muy especializadas en la degradación de hidrocarburos, a las que se le denomina hidrocarbonoclasticas⁴⁶⁻⁴⁸.

2.7.1.1. Vía de degradación de *n*-alcanos

La degradación de este hidrocarburo se da inicio mediante una monooxigenación en la cadena hidrocarbonada, que en función de la posición en que se produce, da lugar a tres rutas metabólicas diferentes: Oxidación terminal, Oxidación subterminal y ω - oxidación.

- ✓ **Oxidación Terminal:** Es la ruta más habitual, en donde una monooxigenasa actúa sobre uno de los carbonos terminales de la molécula para formar un grupo alcohol, enseguida una enzima llamada alcohol deshidrogenasa produce un aldehído que es convertido a ácido graso por acción de otra enzima llamada aldehído deshidrogenasa, mediante la ruta β - oxidación el ácido graso producido, puede incorporar su carbono al metabolismo central.

- ✓ **ω- Oxidación:** Antes de que el ácido graso producido por la oxidación terminal sea degradado por la ruta β- oxidación, esta sufre una segunda monooxidación en el carbono terminal del extremo opuesto de la cadena.
- ✓ **Oxidación subterminal:** Esta se da inicio con la formación de un alcohol secundario que mediante la deshidrogenación da lugar a una cetona subterminal, la cual sufre un segundo ataque monooxigénico o también llamada como la reacción biológica de Beayer – Villiger, para formar un éster que facilita la ruptura de la cadena. La molécula de acetato liberada entra directamente en el metabolismo central, mientras que el *n*-alcohol que se genera se degrada por β- oxidación, esta vía es poco frecuente⁴⁹.

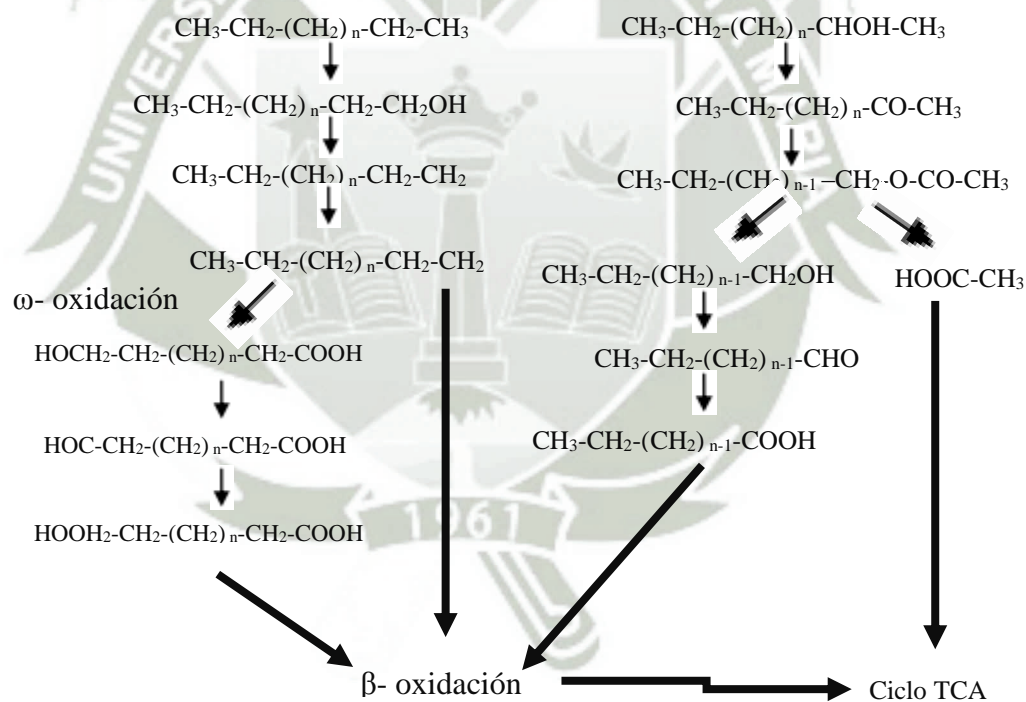


Figura 12. Rutas de degradación microbiana de n-alcanos⁴⁴.

2.7.2. Biodegradación de HAPs

Se han descrito una gran variedad de microorganismos (bacterias y hongos) que tienen la capacidad y estabilidad de degradar compuestos aromáticos de entre 1 a 5 anillos aromáticos⁵⁰

La degradación de HAPs se inicia por la acción de las enzimas dioxigenasas que catalizan la incorporación de dos átomos de oxígeno y dos electrones desde el NADH para formar *cis*-dihidrodiol, estas enzimas dioxigenasas consisten en una reductasa, ferroxidina y una proteína compuesta por hierro y azufre, que catalizan la formación de intermediarios dihidroxilados, que luego son degradados por la ruptura del anillo y posterior formación de intermediarios del ciclo del ácido cítrico⁵¹. Los HAPs pueden ser metabolizados mediante el citocromo P450 monooxigenasas para formar *trans*-dihidrodiol, presentes en bacterias^{52, 53}.

Se sabe muy poco sobre como los HAPs atraviesan las membranas bacterianas para alcanzar las enzimas catabólicas presentes en el citoplasma, algunos mecanismos descritos incluyen tanto difusión pasiva como una captación dependiente de energía que se activaría durante el crecimiento con HAPs como única fuente de carbono^{54, 55}.

2.7.2.1. Vía de degradación de HAPs

Los compuestos aromáticos son más difíciles de degradarse, con respecto a los alifáticos; esto se debe a la mayor estabilidad de los enlaces entre carbonos presentes en su estructura, la degradabilidad disminuye al aumentar el número de carbonos o anillos aromáticos⁵³. Para desestabilizar el anillo aromático, los microorganismos han desarrollado una estrategia común que consiste en la activación mediante la introducción de uno o dos grupos hidroxilo, mediante reacciones catalizadas por mono- o dioxigenasas, respectivamente⁴⁶.

Las rutas metabólicas involucradas en estos procesos generalmente presentan dos etapas clave: la activación del anillo bencénico termodinámicamente

estable y su posterior ruptura⁵⁶. La ruta degradativa de HAPs inicia por la catálisis mediante enzimas oxigenasas, las cuales incorporan uno o dos átomos de oxígeno a uno de los anillos aromáticos de la molécula, estas oxigenasas pertenecen a la superfamilia de las oxigenasas de anillos aromáticos (Gibson y Parales, 2000) o a la superfamilia de las monooxigenasas dependientes de la Flavina⁵⁷.

El segundo paso es mediado por enzimas dihidrodiol deshidrogenasas, las cuales catalizan la deshidrogenación de los HAP-dihidrodiolos formados previamente. Los dioles así generados (HAP-dioles, intermediarios católicos de la vía alta de degradación), luego pueden ser utilizados como sustratos de otra clase de oxigenasas involucradas en la diversificación de estas rutas catabólicas, las oxigenasas de ruptura del anillo aromático.

Dependiendo del tipo de clivaje que realizan, estas oxigenasas pueden ser de dos tipos: extradiol dioxigenasas (EXDO), las cuales catalizan el metaclivaje de los anillos aromáticos; o intradiol dioxigenasas (INDO), las cuales producen la ruptura mediante ortoclivaje. A partir de los productos de reacción obtenidos, la acción consecutiva de enzimas hidratasas, aldolasas y deshidrogenasas permite la formación de intermediarios derivados del salicilato o de ftalato.

Durante el metabolismo de los derivados del ftalato, es posible que se produzca la descarboxilación e hidroxilación de los mismos mediante enzimas oxigenasas/hidroxilasas (DO1) para formar intermediarios de tipo salicilato. A su vez, el anillo aromático de estos últimos intermediarios puede ser sometido a meta u orto-clivaje mediante enzimas EXDO2 e INDO2, respectivamente, generando otros derivados de salicilatos y ftalatos. Alternativamente, la hidroxilación/descarboxilación de los salicilatos mediante enzimas hidroxilasas, también pertenecientes a la superfamilia de oxigenasas con sitio Rieske (S1H) permite generar intermediarios catecólicos (HAP-dioles). Otra vía por la cual se forman HAP-dioles es mediante la descarboxilación de los

intermediarios derivados del ftalato (DC1). Esta reacción da lugar a benzoatos, los cuales por acción de enzimas benzoato dioxigenasas (RHD2) y posterior descarboxilación generan HAP-dioles. Posteriormente, los HAP-dioles pueden ser metabolizados hasta otros compuestos del tipo salicilato, mediante, o ingresar a la vía baja de degradación (Mallick et al., 2011).

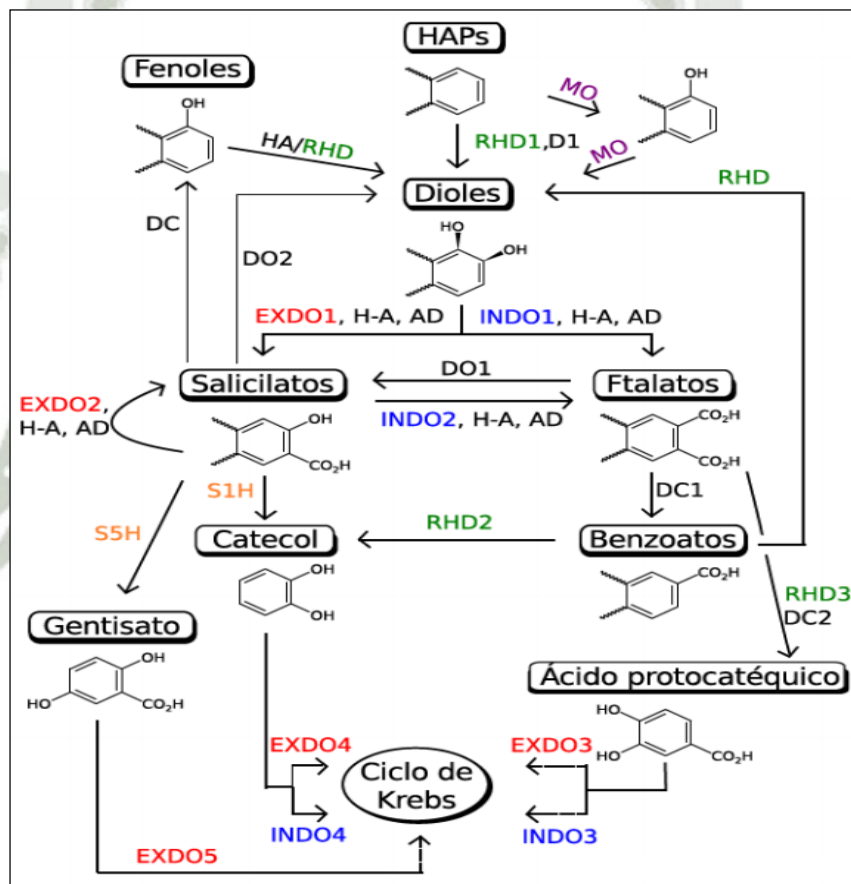


Figura 13. Rutas metabólicas bacterianas en la degradación de HAPs.

2.8. METODOLOGÍAS PARA DETERMINACIÓN DE HTP'S

Para poder determinar HTP's puede realizarse ya sea con muestras húmedas pero se recomienda secarlas para que se homogenizen en su totalidad.

2.8.1. Extracción de Hidrocarburos

Las técnicas más comunes para la extracción de Hidrocarburos son las siguientes:

✓ **Extracción por Soxhlet o Reflujo:**

Es un método analítico usado comúnmente para extraer compuestos orgánicos ya sean volátiles o semivolátiles. Con esta técnica se puede tener un contacto más cercano de la muestra con el solvente de extracción. Para obtener una extracción óptima de los compuestos orgánicos, se deben de tener la muestra en partículas pequeñas. Para el método de Soxhlet se debe tener un solvente adecuado que tenga una alta afinidad por la muestra y baja afinidad por la matriz de la muestra. El solvente a usarse debe tener una alta volatilidad para poder ser removido con facilidad al final de la extracción. El método con Soxhlet tiene una eficiencia de extracción mayor a 80% pero una limitación en cuanto a tiempo y número de muestras a analizar⁹³⁻⁹⁶.

✓ **Extracción por agitación – centrifugación:**

Esta técnica favorece a la extracción, ya que optimiza el tiempo, la cantidad de muestras a analizar y la cantidad de solvente a usar. El método de agitación es la más económica y rápida, debido a que se puede procesar mayor cantidad de muestras en un menor tiempo⁹⁷⁻⁹⁹.

2.8.2. Fraccionamiento de Hidrocarburos

Es recomendable el fraccionamiento de los componentes para realizar la caracterización del tipo de hidrocarburos que se encuentran en la muestra. Este método nos permite hacer el fraccionamiento en una columna empacada con un material muy poroso y granular (alúmina) de pH neutro, separando las fracciones de compuestos alifáticos (1ª fracción), aromáticos (2ª fracción) y nitrogenados (3ª fracción) del petróleo, mediante la elución con diferentes solventes¹⁰⁰⁻¹⁰³.

2.8.3. Cuantificación de Hidrocarburos

✓ Métodos Gravimétricos:

- **Hidrocarburos Totales de petróleo (HTP's):** Este método se utiliza y es recomendado para muestras muy aceitosas, como las que tienen hidrocarburos pesados o para muestras acuosas¹⁰⁴.
- **Asfaltenos insolubles en hexano:** Los asfaltenos son parte de una de las fracciones de los hidrocarburos, son mezclas complejas con un alto peso molecular y contienen a la vez compuestos aromáticos C₃₀, azufre, nitrógeno, amidas, aminas y moléculas con oxígeno. Se hace la cuantificación por método gravimétrico, previa precipitación con solventes^{105,106}.

✓ Métodos Análíticos:

- **Espectroscopia de Infrarrojo (IR):** Es un método rápido, simple y barato pero en ciertas ocasiones presenta limitaciones en cuanto a la exactitud y a la precisión, en especial a muestras que no están homogéneas, ya que no hay

referencia sobre el tipo de hidrocarburos que están presentes en la muestra^{93,100}.

- **Cromatografía de gases (CG):** Nos permite diferenciar los compuestos que tiene la materia orgánica o los productos generados durante todo el tratamiento. Los hidrocarburos son extraídos mediante solventes y detectados por cromatografía de gases. Este método da información acerca de los tipos de petróleo que tiene la muestra y su cuantificación^{93,107,108}.

2.8.4. Identificación de hidrocarburos por Cromatografía de gases – espectrometría de masas (CG/EM)

Esta técnica se utiliza para obtener un análisis detallado del compuesto presente en las muestras, ya que es una técnica de alta sensibilidad capaz de identificar cualquier mezcla de sustancias, tanto cualitativa y cuantitativa, mediante la fragmentación. Este método se usa para medir concentraciones de sustancias volátiles y semivolátiles^{93,109}.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN

El proyecto se realizó en los Laboratorios, de Ing. Genética H-302 y de Microbiología H-403 de la Universidad Católica de Santa María y ciertas muestras fueron enviadas a los Laboratorios Analíticos del sur E.I.R.L. para la medición de HTP's, metales pesados, nitrógeno total, nitratos, nitritos, amonio y sulfatos.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Muestra:

- Tierra del “Taller Mecánica Automotriz 54”.

3.2.2. Material de laboratorio

Medios de cultivo:

- Agar Cetrimide
- Agar Citrato
- Agar Eosina y azul de metileno
- Agar Mc. Conkey
- Agar Manitol Salado
- Agar Nutritivo
- Agar OF
- Agar Papa Dextrosa
- Agar Salmonella Shigella
- Agar Sangre
- Agar SIM

- Agar TSI
- Agar Urea
- Agar Vogues Proskauer
- Caldo Básico de sales (CBS) modificado
- Caldo Nutritivo
- Medio Mineral de Mills y col.
- Medio Mínimo de Goldman y col.

Reactivos:

- Ácido Fosfórico 85%
- Ácido Sulfúrico concentrado
- Alfa - Naftol
- Anaranjado de Metilo
- Buffer 4, 7, 10
- Catalasa
- Cromato de Potasio
- Dicromato de potasio 0.1 M
- Difenilamina
- Etanol
- Éter Etilico
- Extracto de Levadura
- Fenolftaleína
- Glicerol
- Hidróxido de Potasio
- Hidróxido de Sodio 0.1 N
- Hipoclorito de Sodio 5.25%
- Nitrato de Plata
- Oxidasa
- Reactivo de Kovac's
- Rojo de Metilo

- Solución Urea 40%
- Sulfato Ferroso Amoniacal

Materiales de vidrio:

- Beakers 100, 150, 250 mL
- Baguetas
- Bureta 25 mL
- Celdas de espectrofotómetro
- Desecador
- Embudo
- Fiolas 100 mL
- Frascos de 30, 50, 100 mL
- Láminas portaobjetos
- Matraz Erlenmeyer 100, 125, 250, 500 mL
- Pipetas 1, 2, 5 mL
- Placas Petri
- Probetas 10, 50, 100 mL
- Tubos de ensayo 10 mL

Equipos:

- Autoclave
- Agitador magnético
- Balanza analítica
- Cámara de Flujo Laminar
- Centrífuga
- Cocinilla
- Conductímetro digital
- Equipo de destilación
- Espectrofotómetro
- Estufa
- Incubadora

- Microscopio
- Ph-metro
- Shaker
- Soxhlet

Otros:

- Aceite de Inmersión
- Agua destilada
- Agitador Magnético
- Alcohol 60°, 90°
- Algodón
- Asa de Khole
- Balde
- Caja de Tecknopor
- Cámara de Neubauer
- Cinta Masking tape
- Clavos
- Cloranfenicol
- Crisol
- Encendedor
- Envases de plástico estéril
- Escala de Mc. Farland
- Espátula
- Gaza
- Guantes
- Lavadores
- Mechero
- Micropipetas
- Pabulo

- Pala
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Parafina Líquida
- Petróleo
- Pinzas
- Pinzas para soporte
- Piseta
- Placas Petri
- Propipeta
- Puntas 20 μ l para Micropipetas
- Regadora o manguera
- Soporte Universal
- Tamiz 2 mm
- Termómetro digital
- Tijeras de jardinería
- Tijeras
- Tinción GRAM
- Tiras de pH
- Tubos de centrifuga Falcon 15 mL
- Tubos de PVC

Material Orgánico

- Cáscaras
- Estiércol de animales de corral
- Estiércol de ovejas y cabras
- Hojas frescas, secas y ramas
- Lombrices de tierra
- Malezas jóvenes
- Restos de la siega de césped

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Análisis fisicoquímico de la muestra

3.3.1.1. Procedencia y obtención de la muestra

Se hizo la recolección de muestra de suelo del “Taller Mecánica Automotriz 54” de la siguiente forma: se identificó el punto de muestreo de una área de 30cm x 20cm, y se procedió a recolectar las muestras, las cuales fueron divididas en 3 partes; superficie, medio e inferior (no mayor de 30 cm)¹¹⁰, éstas se depositaron en bolsas de polietileno estériles, las cuáles fueron rotuladas y se conservaron en refrigeración (4- 6°C) hasta su procesamiento.

Tabla 13. Zona, ubicación y profundidad de muestreo.

Ubicación	Divisiones	Profundidad de muestreo (cm)
UPIS Mercado Mayorista Mz. D, Lote 1, Zona B, Cono Norte – Cerro Colorado. Arequipa.	Superficie	0
	Medio	15
	Inferior	30

3.3.1.2. Análisis organoléptico

Las muestras se observaron para reconocer su color, se olfateo para identificar el olor y se tocó para diferenciar la Textura.

3.3.1.3. Determinación de pH

Se pesó 10 g de muestra de suelo de las zonas superficie, medio e inferior y se colocó en vasos de precipitado de 100 mL, posteriormente se le adicionó 25 mL de agua destilada, hasta que cubra la muestra totalmente. Se agitó vigorosamente la muestra por 10 minutos y se dejó reposar por 30 minutos. Previamente se hizo el calibrado del pH-metro con las soluciones buffer de pH 4.00, 7.00 y 10.00. Luego, se introdujo el electrodo en la muestra y se procedió a realizar la lectura de pH.

3.3.1.4. Determinación de humedad:

Se pesó los crisoles a usar y luego 2,5 g de muestra de suelo de las zonas superficie, medio e inferior, luego se colocó los crisoles con las muestras en la estufa a 100°C por 24 horas. Pasado el tiempo se sacó las muestras de la estufa y se colocó dentro de un desecador para que se enfríen. Se pesó las muestras con el crisol y se calculó los porcentajes de humedad en el suelo por la diferencia de pesos, utilizando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Humedad del suelo} = \frac{(W_1 - W_2)}{(W_2 - W_3)} \times 100 \dots\dots \text{Ec. 1}$$

Donde:

W₁: Peso del crisol más la muestra húmeda (g)

W₂: Peso del crisol más la muestra seca (g)

W₃: Peso del crisol (g)

3.3.1.5. Determinación de conductividad eléctrica (mS/cm):

Se pesó 20 g de muestra de suelo de las zonas superficie, medio e inferior a la que se le añadió 100 mL de agua destilada. Se agitó vigorosamente estas soluciones con

un agitador mecánico o magnético, se dejó reposar por 30 minutos. Se filtró las muestras y se sometió directamente a su lectura al conductímetro digital.

3.3.1.6. Determinación de Materia orgánica

Se determinó la materia orgánica de la muestra de suelo mediante el método de *Walkley y Black*. En un Erlenmeyer de 250 mL se colocó 0.30 g de muestra de suelo seca de las zonas superficie, medio e inferior, tamizadas previamente; se agregó 5 mL de dicromato de potasio 0.1M y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, y se agitó vigorosamente durante un minuto. Se dejó en reposo hasta que alcanzó temperatura ambiente (aproximadamente 30 min), posteriormente se enrazó a un volumen de 70 mL con agua destilada y 3 mL de ácido fosfórico al 85%. Finalmente se agregó 0.5 mL o 3 gotas de solución indicadora de Difenilamina y se tituló con solución de Sulfato Ferroso amoniacal hasta el viraje de color de azul a un verde brillante.

Para la preparación del blanco se realizó el mismo procedimiento, sin adición de muestra. Una vez obtenidos los datos, se calculó la normalidad del Sulfato ferroso amoniacal la cual fue empleada en la titulación.

✓ Estandarización de la solución de Sulfato ferroso amoniacal

La solución de Sulfato ferroso amoniacal, consumido para valorar el blanco (5 mL de solución 0.1M de $K_2Cr_2O_7$), fue de 6.5 mL. Se calculó la concentración estandarizada de solución de Sulfato ferroso amoniacal, con la siguiente fórmula:

$$Mol. \text{ solución } n \text{ ferrosa} = \frac{mLK_2Cr_2 \times MK_2Cr_2O_7}{mLFe(NH_4)_2(SO_4)_2} = X \frac{mol}{L} \dots\dots Ec. 2$$

✓ **Determinación de carbono orgánico en muestras de suelo:**

Usando las ecuaciones descritas a continuación, se calculó el contenido de carbono orgánico y materia orgánica.

$$\text{Carbono Organico} = \frac{(B-V) \times M \times 0.003 \times 1.3 \times 100}{Pm} \dots\dots \text{Ec. 3}$$

$$\text{Materia Organica} = \text{Carbono Organico} \times 1.724 \dots\dots \text{Ec. 4}$$

Donde:

B: Volumen de solución ferrosa consumidos en el blanco (mL)

V: Volumen de solución ferrosa consumidos en la muestra (mL)

M: Molaridad de la solución ferrosa (X mol/L)

0.003: peso equivalente del carbón (g/mEq)

1.3: Factor de la eficiencia en la reacción de oxidación del carbono orgánico

Pm: Peso de la muestra (g)

1.724: factor de relación de contenido de carbono en la materia orgánica

3.3.1.7. Preparación de muestra para la determinación de carbonatos, bicarbonatos y cloruros

Se preparó la muestra de la siguiente manera:

- Se pesó 50 g de muestra de suelo; superficie, medio e inferior; las cuales fueron tamizadas, luego se colocó en botellas de vidrio de un litro de capacidad, a cada una de éstas se adicionó 500 mL de agua destilada y se agitó por 40 minutos.
- Se colocó en reposo por una semana para que sedimenten. Luego se realizó los siguientes análisis utilizando los sobrenadantes de las muestras, los cuales fueron filtrados sin agitar los frascos.

✓ **Determinación de Carbonatos:**

Se utilizó 25 mL de los sobrenadantes de muestras de suelo de las zonas superficie, medio e inferior y se agregó 0.8 mL de Fenolftaleína y se tituló con NaOH (0.1 N) hasta tornarse color grosella y se apuntó el gasto.

$$\frac{meq}{L} = \frac{\text{Gasto de NaOH}}{\text{ml de muestra}} \times N(\text{mEq/ml}) \times 1000 \left(\frac{ml}{L}\right) \dots\dots \text{Ec. 5}$$

✓ **Determinación de Bicarbonatos:**

Se utilizó 25 mL de los sobrenadantes de muestras de suelo de las zonas superficie, medio e inferior, se añadió 1 ó 2 gotas de anaranjado de metilo como indicador tornándose de color amarillo y se tituló con H₂SO₄ (0.02N) hasta que viraron al color anaranjado y se apuntó el gasto.

$$\frac{meq}{L} = \frac{\text{Gasto de H}_2\text{SO}_4}{\text{ml de muestra}} \times N(\text{mEq/ml}) \times 1000 \left(\frac{ml}{L}\right) \dots\dots \text{Ec. 6}$$

✓ **Determinación de Cloruros:**

Se utilizó 100 ml de los sobrenadantes de muestras de suelo de las zonas superficie, medio e inferior, se añadió 3 gotas de Cromato de Potasio y se tituló con AgNO₃ (0.0282 N) tornándose hasta un color anaranjado ladrillo y se apuntó el gasto

$$meq \frac{Cl^-}{L} = \frac{\text{Gasto de AgNO}_3}{\text{ml de muestra}} \times N(\text{mEq/ml}) \times 1000 \left(\frac{ml}{L}\right) \dots\dots \text{Ec. 7}$$

3.3.1.8. Determinación de grasas (Soxhlet):

Se pesó 3 g de muestra de suelo de las zonas de superficie, medio e inferior, usando el papel filtro se hizo paquetes pequeños para que las muestras queden seguras; se armó el equipo de Soxhlet y se colocó el paquete en la cámara de extracción. Se pesó y anotó el peso del balón vacío, en el cuál se depositó posteriormente la grasa. Se fijó el balón en la parte inferior del Soxhlet en forma segura, con el fin de evitar la fuga del éter etílico; por la parte posterior del Soxhlet se vertió 120 mL de éter etílico. Se fijó el Soxhlet a la parte superior del refrigerante y se empezó la extracción durante 4 horas.

Se recuperó el solvente a medida que se condense en la cámara de extracción, se dejó unos minutos el balón sobre la hornilla para que se evapore completamente el solvente y sólo obtener grasa. Se dejó enfriar en el desecador, se pesó y anotó el peso del balón de grasa.

Fórmula:

$$\% \text{ Grasas} = \frac{(W_3 - W_1)}{W_2} \times 100 \dots\dots \text{Ec. 8}$$

Dónde:

W₁: peso del balón vacío (g).

W₂: peso de muestra (g).

W₃: peso de balón con grasa (g).

3.3.1.9. Determinación de Nitrógeno total:

Para la determinación de nitrógeno total de muestras de suelo de las zonas superficie, medio e inferior, se envió a analizar en los Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.Ltda ubicado en el Parque Industrial Rio Seco C-1, Cerro Colorado – Arequipa, a cargo del Ing. Omar A. Juárez Soto (CIP No. 114426).

NOTA: El método más utilizado para la determinación de nitrógeno total es el Método de Kjeldahl¹¹¹; pero al laboratorio donde se mandó a analizar las muestras utilizaron un Ensayo de Nitrógeno total por destilación – fotometría.

Este método Kjeldahl comprende tres fases:

- a) **Digestión de la muestra.** La muestra de suelo se somete a una digestión por calentamiento con ácido sulfúrico y por una mezcla de sales que aceleran y facilitan tanto la oxidación de la materia orgánica como la conversión de todas las formas de nitrógeno en N^{+3} , que en medio ácido se encuentran en forma de radical amonio (NH_4^+); es decir, se llevan las formas orgánicas a formas minerales de nitrógeno.
- b) **Destilación.** Una vez que se ha transformado el nitrógeno en NH_4^+ , se expone a una base fuerte como el hidróxido de sodio para formar hidróxido de amonio, que por la acción del calor se descompone en amoníaco (NH_3) y agua.
- c) **Valoración.** El amoníaco desprendido por la reacción se recoge en un volumen conocido de solución valorada de ácido bórico y por comparación con un blanco se determina la cantidad de ácido que reaccionó con el NH_3 .

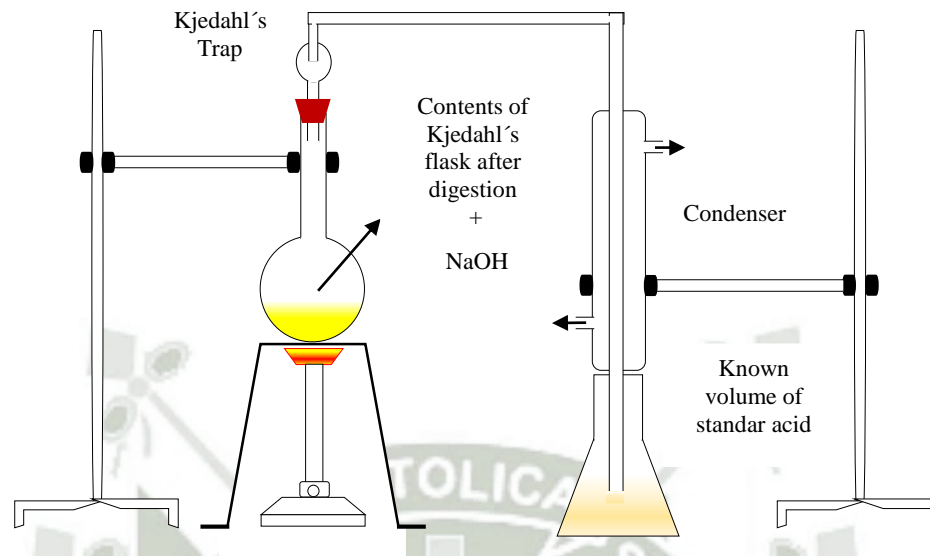


Figura 14. Método de Kjeldahl¹¹¹.

3.3.1.10. Determinación de nitritos, nitratos, Amonio y Sulfatos.

Para la determinación de nitritos, nitratos, Amonio y Sulfatos en las muestras de suelo de las zonas superficie, medio e inferior se recurrió a los servicios de Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.Ltda ubicado en el parque industrial Rio Seco C-1 Cerro Colorado – Arequipa, a cargo del Ing. Omar A. Juárez Soto (CIP No. 114426).

3.3.1.11. Determinación de metales y elementos traza (ICP-AES)

Para la determinación de estos elementos en las muestras de suelo de las zonas superficie, medio e inferior se recurrió a los servicios de Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.Ltda ubicado en el parque industrial Rio Seco C-1 Cerro Colorado – Arequipa, a cargo del Ing. Omar A. Juárez Soto (CIP No. 114426).

Fundamento

El ICP-AES (espectroscopia de plasma): El plasma de acoplamiento inductivo (ICP) es una fuente de ionización que junto a un espectrofotómetro de emisión atómica (AES) constituye el equipo de ICP-AES. Este método proporciona un medio rápido y preciso de supervisar hasta 50 elementos simultáneamente para niveles menores y de traza. Cuando la solución de muestra se introduce en el espectrómetro, se atomiza en una nube de tipo niebla. Esta niebla se lleva al plasma de argón con una corriente de gas. El plasma (argón ionizado) produce temperaturas cercanas a 7.000°C , que excita térmicamente los electrones de la capa exterior de los elementos de la muestra^{112,113}.

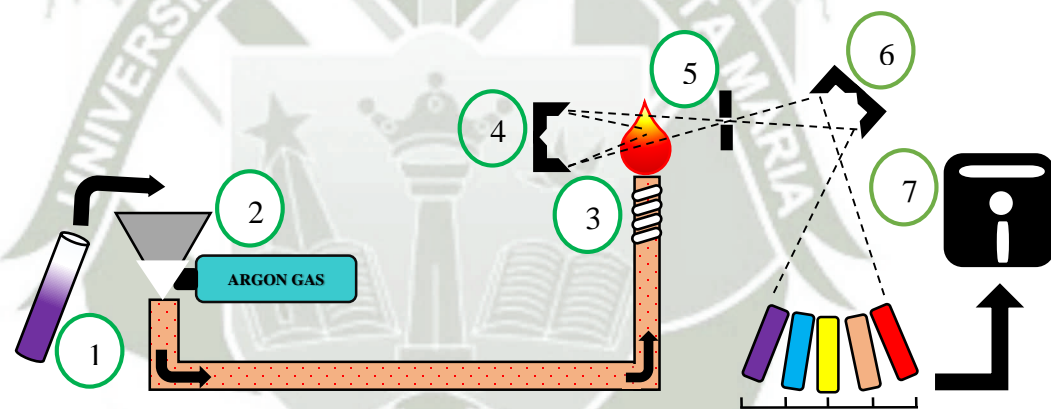


Figura 15. Espectrómetro de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente¹¹².

En un espectrómetro de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente, se bombea la muestra acuosa (1) y (2) se atomiza con gas argón en el plasma caliente (3). La muestra se excita, emitiendo longitudes de onda de luz características de sus elementos. (4) Un espejo refleja la luz a través de la ranura de entrada (5) del espectrómetro sobre una rejilla (6) que separa las longitudes de onda del elemento en (7) detectores fotomultiplicadores.

3.3.1.12. Determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo

Para la determinación de HTP's en las muestras de suelo de las zonas superficie, medio e inferior se recurrió a los servicios de Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.Ltda ubicado en el parque industrial Rio Seco C-1 Cerro Colorado – Arequipa, a cargo del Ing. Omar A. Juárez Soto (CIP No. 114426).

Fundamento

El método Soxhlet se utiliza para la extracción de compuestos orgánicos no volátiles y semivolátiles de sólidos, este procedimiento provee fracciones de C6 a C50⁹³. Después de realizar la extracción de HTP's se procede a la cuantificación mediante el método gravimétrico en el cuál los hidrocarburos totales de petróleo son extraídos en un solvente adecuado¹⁰⁴.

3.3.2. Aislamiento, caracterización e identificación de microorganismos

3.3.2.1. Tratamiento de la muestra

De las muestras que se obtuvo, se pesó 100 g de cada una y se colocó en un medio especial, Caldo Básico de Sales (CBS) modificado como se muestra en la **Tabla 14**; todas las muestras fueron llevadas a un volumen final de 250 mL de medio, luego se dejó a una temperatura ambiente con agitación constante en el Shaker, durante una semana; este tratamiento se hizo para obtener microorganismos de cada muestra.

Tabla 14. Composición del Caldo Básico de sales modificado¹¹⁴.

Sales	Cantidad (g/L)
NaCl	0.6
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.2
KH ₂ PO ₄	1.98
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3
KNO ₃	1.2

3.3.2.2. Aislamiento de microorganismos

✓ Preparación de medios de cultivo

Se preparó Agar Nutritivo, Agar Mc. Conkey, Agar Manitol, Agar Eosina y azul de metileno, Agar Cetrimide, Agar Salmonella Shigella, Agar Sangre y Agar Papa Dextrosa; para cada muestra de suelo de las zonas superficie, medio e inferior.

Luego de preparar los medios de cultivo se procedió a sembrar las muestras que fueron inoculadas en el Caldo Básico de Sales (CBS) modificado, se dejó en la incubadora por 24-48 h a 37°C, excepto Agar PDA que se incubo a temperatura ambiente y en oscuridad.

- ✓ Pasada las 48 horas se seleccionó bacterias con diferentes características que fueron observadas a simple vista.

3.3.2.3. Identificación de Microorganismos

✓ Activación de colonias

Se activó las colonias que fueron seleccionadas en los distintos medios de cultivo, empleando Caldo Nutritivo y se dejó en la incubadora por 24 – 48 horas a 37°C.

Tabla 15. Composición del Caldo Nutritivo.

Sustancia	Cantidad (g/L)
Pluripeptona	5
Extracto de Carne	3

✓ Preparación de Medios Selectivos

Se preparó 5 medios selectivos y luego se sembró las cepas seleccionadas.

- **Agar Eosina y azul de metileno (EMB):** Este medio fue empleado para el aislamiento selectivo de bacterias gram negativas (enterobacterias), los colorantes inhiben el crecimiento de las gram positivas. Inhibidores: eosina y azul de metileno, la lactosa actúa como agente diferencial; se sembró por estría y se incubó de 24 a 48 horas a 37°C.
- **Agar Mc. Conkey:** Este medio fue empleado para el aislamiento de bacilos gram negativos y para diferenciar bacterias que utilizan o no la lactosa. Inhibidor: Sales biliares y cristal violeta, inhibe el crecimiento de bacterias gram positivas; se sembró por estría y se incubó de 24 a 48 horas a 37°C.

- **Agar Cetrimide:** Este medio fue empleado para el aislamiento selectivo de gram negativos y estimula la formación de pigmentos. Inhibidor: cetrimida y el cloruro de magnesio con el sulfato de potasio promueven la formación de piocianina, pioverdina, piomelamina; se sembró por estría y se incubó de 24 a 48 horas a 37°C.
- **Agar Manitol Salado:** Este medio fue empleado para el aislamiento y diferenciación de Staphylococcus. Inhibidor: Cloruro de Sodio. Indicador: Rojo de Fenol; se sembró por estría y se incubó de 24 a 48 horas a 37°C.
- **Agar Sangre:** Este medio fue empleado para el aislamiento de los microorganismos aerobio y anaerobios, para la observación de reacciones de los diferentes tipos de Hemolisis; se sembró por estría y se incubó de 24 a 48 horas a 37°C

3.3.2.4. Caracterización Morfológica y Bioquímica

Para la caracterización de las cepas, se seleccionó las bacterias que crecieron en la parte superficial de la muestra de suelo, ya que en la parte media e inferior las bacterias fueron iguales.

✓ Caracterización Macroscópica

Para esta caracterización, se tuvo en cuenta parámetros como forma, color, borde y tamaño de colonias mediante la inspección visual, formadas sobre la superficie del medio sólido.

✓ **Caracterización Microscópica**

Se utilizó la tinción de Gram, la cual permitió observar la morfología y el grupo al cual pertenecen las cepas que crecieron en el medio sólido, luego se observó al microscopio a 10X, 40X 100X.

✓ **Pruebas Bioquímicas**

Las cepas aisladas fueron identificadas empleando las siguientes pruebas bioquímicas:

- **Medio SIM:** Cada cepa aislada se sembró por punción (3) y se llevó a incubar de 24-48 h a 37°C; en esta prueba se determinó la motilidad, la capacidad de producir ácido sulfhídrico, la presencia de indol con la adición del reactivo de Kovacs.
- **Medio TSI:** Cada cepa aislada se sembró por punción y extendiendo sobre la superficie del medio. Se llevó a incubar de 24-48 h a 37°C; en esta prueba se determinó la fermentación de azúcares (lactosa y glucosa), la producción de CO₂ y ácido sulfhídrico.
- **Medio LIA:** Cada cepa aislada se sembró por punción y se llevó a incubar de 24-48 h a 37°C; en esta prueba se determinó la descarboxilación, desaminación de la lisina y producción de ácido sulfhídrico.
- **Medio Citrato Simmons:** Cada cepa aislada se sembró sobre la superficie del medio por estría y se llevó a incubar de 24-48 h a 37°C; en esta prueba se determinó la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono.

- **Medio Urea:** Cada cepa aislada se sembró sobre la superficie del medio por estría y se llevó a incubar de 24-48 h a 37°C; en esta prueba se determinó la hidrólisis de la urea dando lugar a carbonato amoniaco.
- **Medio Hugh Leifson (OF):** Cada cepa aislada se sembró en 2 tubos (aerobiosis y anaerobiosis) por punción y se llevó a incubar de 24-48 h a 37°C; en esta prueba se determinó el uso del hidrato de carbono, ya sea por fermentación u oxidación, produce acidez en el medio.
- **Medio MR-VP:**
 - **MR:** Cada cepa aislada se inoculó en el caldo y se llevó a incubar de 24-48 h a 37°C; para esta prueba se agregó 5 gotas de reactivo Rojo de Metilo y se determinó la producción de ácido (láctico, fórmico y acético) a partir de la glucosa, por la vía de la fermentación ácido mixto.
 - **VP:** Cada cepa aislada se inoculó en el caldo y se llevó a incubar de 24-48 h a 37°C; para esta prueba se agregó gotas de α -Naftol, KOH al 40% y se dejó reposar por 10 min. Se determinó la presencia de diacetilo producto de la oxidación de la acetoina.
- **Catalasa:** De cada cepa se tomó una colonia que fue depositada en una lámina portaobjetos y se le adicionó una gota de H₂O₂ 3%. Se observó la formación de burbujas que nos indicó la presencia del enzima catalasa en las bacterias.
- **Oxidasa:** De cada cepa se tomó una colonia que fue depositada en una lámina portaobjetos y se le adicionó una gota de Reactivo Oxidasa. Se

observó si cambia de color a púrpura en 10 segundos. Luego de haber realizado las pruebas bioquímicas respectivas, las placas fueron conservadas en refrigeración a 4°C para realizar otras pruebas necesarias.

3.3.3. Biocompatibilidad de microorganismos

Las cepas seleccionadas se activaron en Caldo Nutritivo por 24 - 48 h a 37°C. Luego se preparó placas Petri con Agar Nutritivo y las bacterias se sembró por estría de la siguiente manera:

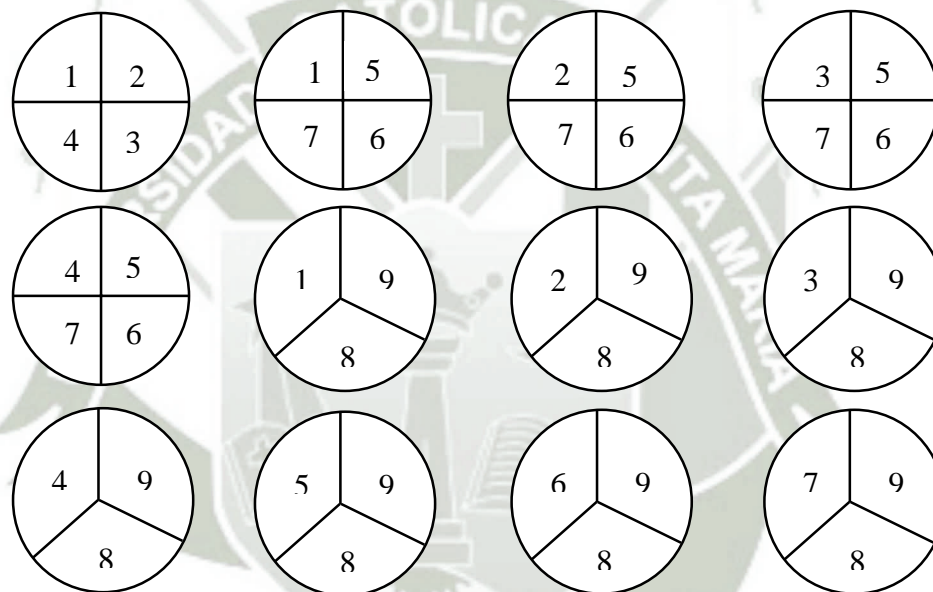


Figura 16. Biocompatibilidad.

Se llevó a incubar por 24 – 48 horas a 37°C.

3.3.4. Actividad Emulsificante de los microorganismos

En esta prueba se utilizó la metodología propuesta por Goldman y col. (1982), para poder determinar la capacidad de las cepas para producir emulsificantes de petróleo en agua. Para esto se empleó el Medio Mínimo de Goldman (Anexo 01), al cual se

agregó extracto de levadura al 3% P/V (peso sobre volumen). Se le adicionó petróleo crudo para luego esterilizar el medio por 15 min a 121°C, excepto el etanol, el cual se agregó después en condiciones estériles.

Se colocó 2 mL de cepas bacterianas activadas anteriormente en matraces diferentes de 50 mL, se agregó 18 ml de Medio Mínimo de Goldman, luego fueron incubados a 30°C por 72 horas con agitación constante. Después de las 72 horas, se procedió a centrifugar en tubos de ensayo de 13 x 100 mm, cada una de las cepas bacterianas, a 5000 rpm por 30 minutos. Se trasvasó 10 mL de los sobrenadantes de cada cepa bacteriana a distintos tubos falcón estériles de 15 mL y se añadió 0.2 mL de petróleo crudo, se agito por 5 minutos, luego se procedió a leer la absorbancia en el Espectrofotómetro a 540 de longitud de onda.

Al blanco se le coloco 2mL de medio de cultivo sin el inoculo y se hizo el mismo procedimiento de las muestras anteriores.

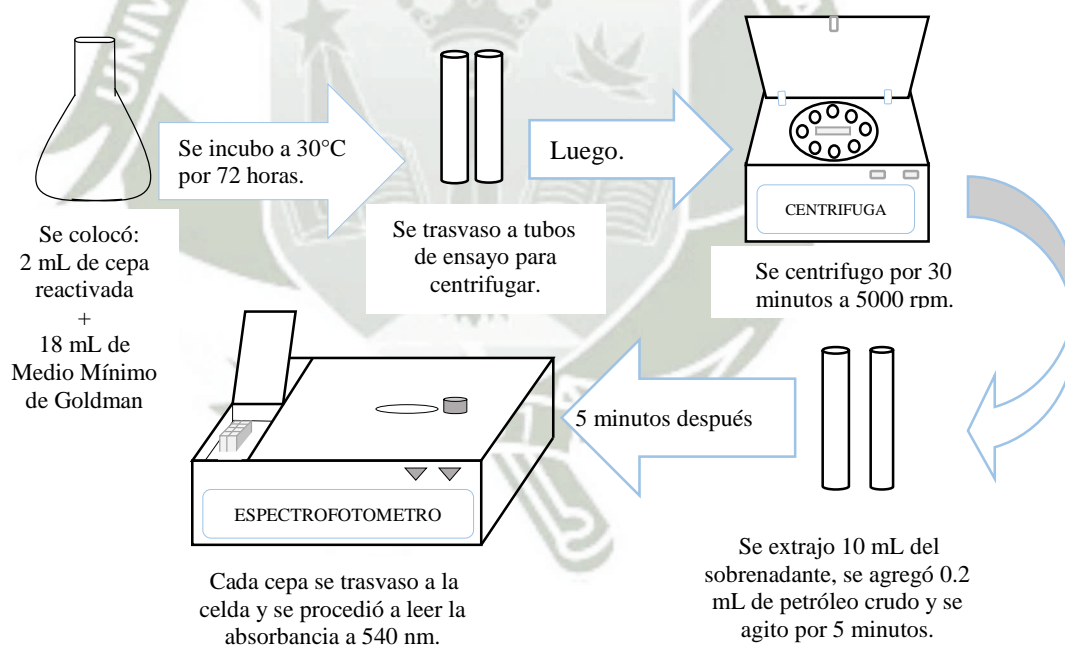


Figura 17. Protocolo de Actividad Emulsificante

- *Se realizó el mismo procedimiento para el blanco pero sin cepa bacteriana.*

3.3.5. Actividad Degradativa de los microorganismos

Esta prueba se aplicó a las cepas bacterianas con Actividad Emulsificante utilizando la metodología de Mills y col. (1978) (Anexo 02). Se empleó el Medio Mineral. Se colocó 1 mL de cepas bacterianas activadas anteriormente en tubos Falcón de 15 mL, se agregó 9 mL del Medio Mineral, luego fueron incubadas a T° ambiente por 30 días. El crecimiento se midió por la turbidez en el medio comparándolas con la escala de Mc. Farland.

Al blanco se le colocó 1 mL de medio de cultivo sin el inóculo y se hizo el mismo procedimiento de las muestras anteriores.

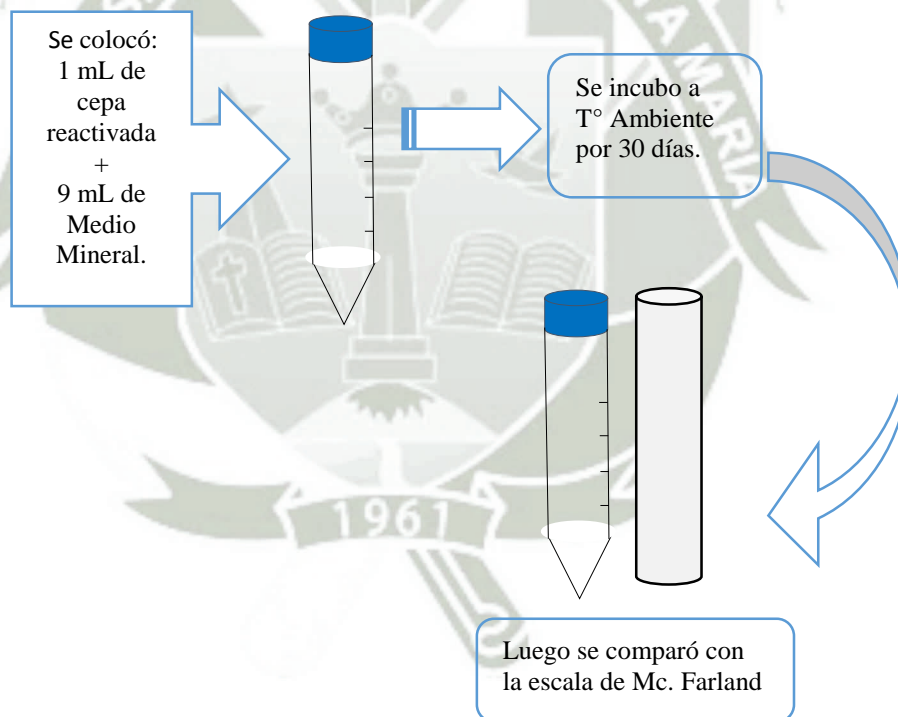


Figura 18. Protocolo de Actividad Degradativa

- *Se hizo el mismo procedimiento para el blanco pero sin cepa bacteriana.*

3.3.6. Caracterización Molecular

3.3.6.1. Cepas Seleccionadas

De las cepas seleccionadas anteriormente, algunas de estas dieron valores óptimos en la actividad emulsificante y degradativa.

Para llevar a cabo la caracterización molecular se hizo la activación de las cepas que tuvieron valores óptimos en la actividad emulsificante y degradativa, para luego sembrarlas en sus medios selectivos Agar Eosina y azul de metileno, Agar Nutritivo, Agar Cetrimide y Agar Manitol.

3.3.6.2. Extracción de DNA (Método fenol - cloroformo)

- Se cargó un tubo eppendorf con 500 uL de agua destilada o buffer PBS.
- Se tomó una pequeña muestra de las bacterias con un tip, se colocó en el tubo eppendorf mencionado anteriormente y se agitó bien para que se suelten del tip.
- Luego se agregó microperlas de vidrio estériles, aproximadamente 100uL (este volumen se puede medir utilizando las marcas en el mismo tubo).
- Se tapó bien el tubo y se sometió a movimiento, utilizando un vórtex en 3 rondas de 1 minuto cada uno (las pausas son necesarias para revisar la integridad del tubo y evitar perder la muestra).
- Una vez que las bacterias fueron lisadas gracias a las perlas, se recuperó la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo y se aplicó de 1.5 a 2 volúmenes de fenol-cloroformo; se agitó vigorosamente hasta que se logró ver una mezcla blanquecina similar a la leche y se centrifugó el tubo a 10000 rpm durante 10 minutos para separar las fases.

- Transcurrido el tiempo, se recuperó la fase superior cuidadosamente, sin absorber la interfase de debris celular, de esta forma se aseguró de no contaminar la fase acuosa recuperada con proteínas, lípidos, carbohidratos o agentes químicos utilizados anteriormente.
- La fase acuosa recuperada en otro tubo eppendorf se mezcló con alcohol isopropílico frío (este debe ser refrigerado con anterioridad) en 1.5 a 2 volúmenes de esta. (Si el alcohol no ha sido refrigerado, se debe colocar el tubo con la mezcla en congelamiento durante 10 minutos, la temperatura es fundamental para precipitar el ADN).
- Se centrifugó el tubo a 10000 rpm durante 10 minutos, esto permitió que el ADN se precipite al fondo del tubo ya que este es insoluble en Isopropanol. Una vez terminada la centrifugación se descartó cuidadosamente el alcohol para no perder el pellet de ADN y se agregó etanol al 70-75%, ya no fue necesario agitar el tubo, pues el etanol solo se encarga de “lavar” al Isopropanol y se centrifugó durante 2 minutos a la misma velocidad.
- Una vez transcurridos los 2 minutos se eliminó el etanol y se colocó el tubo en un termoblock para evaporar los residuos de alcohol, posteriormente se resuspendió el pellet en 100uL de agua ultrapura.

3.3.6.3. Amplificación usando PCR

El DNA fue amplificado con 35 ciclos usando las condiciones de amplificación: desnaturalización a 94 °C, 1 min; alineamiento a 54 °C, 1 min; polimerización a 72 °C, 1 min. La desnaturalización inicial fue ejecutada a 94 °C por 5 min y un paso de extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR (10 mL de cada mezcla de reacción) fueron analizados en un gel de agarosa al 1.5 % (p/v) con Buffer TAE 1X (Trisacetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) y teñido con Bromuro de etidio. Se usaron 2 marcadores de talla

molecular de DNA de 100 y 25 pb usados como estándares. Los geles fueron corridos durante 1 hora.

La purificación de los productos de PCR a partir de agarosa se llevó a cabo con el kit QIAquick Gel Extraction aproximadamente a 150 V, 250 mA y el DNA fue visualizado con un transiluminador UV.

3.3.6.4. Secuenciación RNAr 16S y obtención del Árbol Filogenético de cada cepa

Las secuencias de nucleótidos que codifican los genes del 16S RNAr de bacterias degradadoras de HTP's fueron depositadas en la base de datos de la NBCI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Posteriormente se compararon con las secuencias disponibles en el GenBank Database: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Luego de hacer la comparación se utilizó el programa Cluster Omega <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> para obtener el Árbol Filogenético.

3.3.7. Diseño y construcción de biopilas con “tierra”

3.3.7.1. Construcción de Biopilas con tierra

Para la elaboración del sistema de biopilas se usó 4 lavadores de plástico (10 cm x 25 cm x 35 cm), se colocó un tubo con agujeros en el centro para facilitar la recolección del lixiviado, luego fueron esterilizadas con agua caliente (3 veces) y desinfectadas con etanol al 90%; estos sistemas fueron los siguientes:

✓ Biopila Testigo

En este lavador se colocó 10 Kg de tierra, procedente del mismo sitio de donde se extrajo las muestras, a la cual no se le hizo ningún tratamiento manteniéndola

en condiciones normales; se evaluó la influencia de los microorganismos nativos del suelo en la biodegradación de HTP's.



Figura 19. Testigo - tierra

✓ **Biopila Experimental 1 (Exp 1)**

En esta Biopila se colocó 10 Kg de tierra limpia que se autoclavó (3 veces) a 15 psi, 121°C por 20 minutos, procedente de la zona de donde se extrajeron las muestras, posteriormente se mezcló Petróleo crudo, no más de 5 cm de profundidad y se inoculó con el consorcio bacteriano seleccionado, los días 0 y 20; este consorcio fue reactivado en Caldo Nutritivo. Se evaluó la influencia del consorcio bacteriano en la biodegradación de HTP's.



Figura 20. Experimental 1 - tierra

3.3.8. Diseño y construcción de biopilas con “abonos orgánicos”

3.3.8.1.Compost

✓ Diseño de la compostera :

En un balde de color oscuro de 60 cm de altura con diámetro de 30 cm, se le hizo agujeros de la siguiente manera:

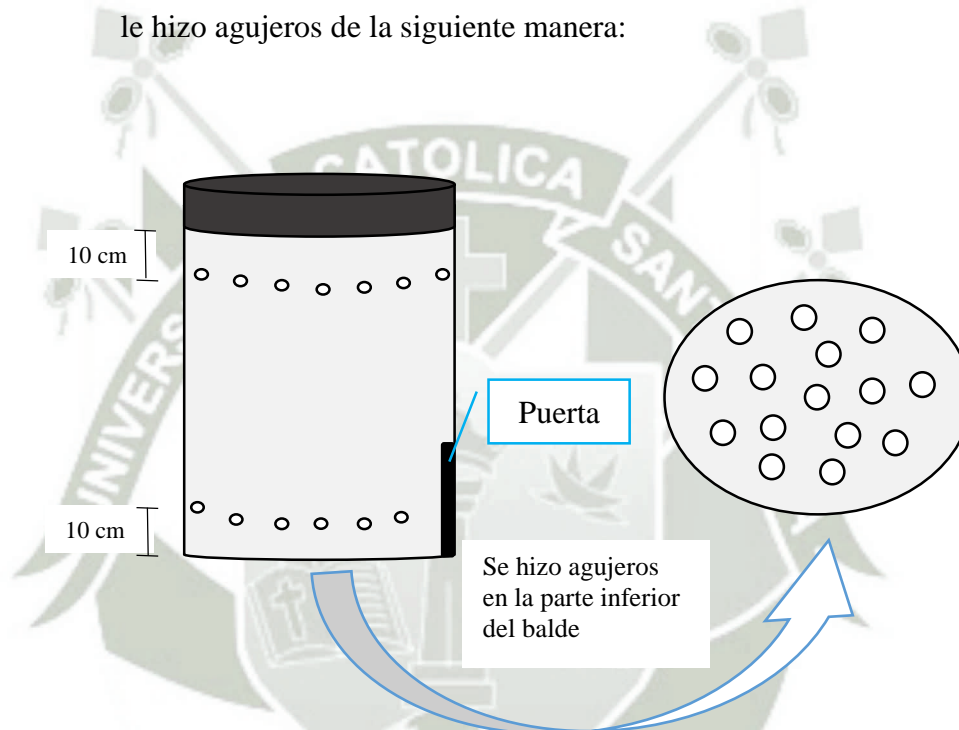


Figura 21. Bosquejo de la compostera

✓ Preparación del Compost:

En la compostera se colocó una base de 10 cm de hojas, tallos secos, y sobre esta una capa de 10 cm de materia orgánica, este procedimiento se hizo intercaladamente hasta que queden 5 capas, terminando con una capa de hojas secas, por último, se le roció con agua.

Con ayuda de un palo de 70 cm se hizo agujeros que traspasen las capas para que haya intercambio de oxígeno. La compostera se dejó por 2 meses y medio.

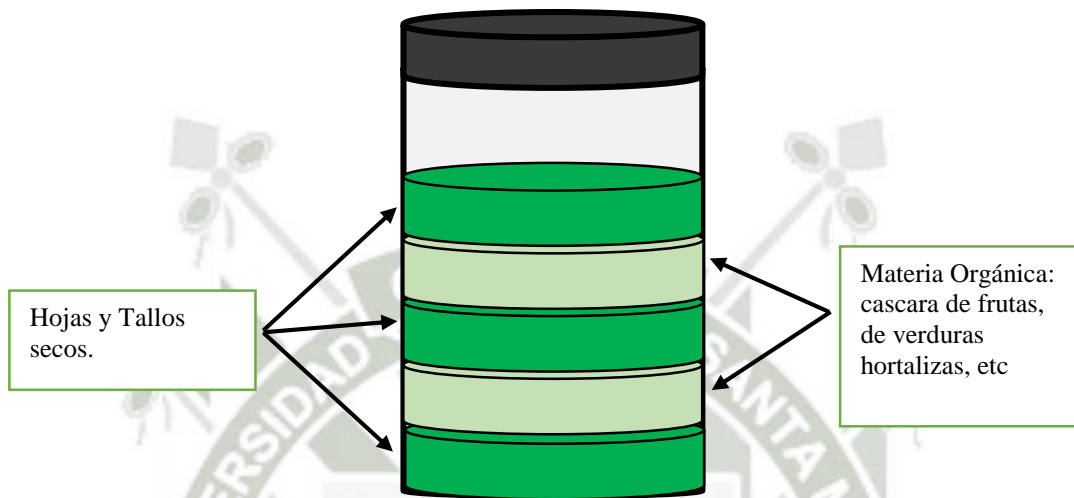


Figura 22. Distribución de capas

✓ **Construcción de biopilas con Compost:**

✓ **Biopila Experimental 2 (Exp 2)**

En esta Biopila se mezcló 10 Kg de compost que se autoclavó (3 veces) a 15 psi, 121°C por 20 minutos, con Petróleo crudo, no más de 5 cm de profundidad; se inoculó con el consorcio bacteriano seleccionado, los días 0 y 20; este consorcio fue reactivado en Caldo Nutritivo. Se evaluó la influencia del consorcio bacteriano en la biodegradación de HTP's.



Figura 23. Experimental 2 – compost

3.3.8.2.Humus:

✓ Diseño de la lombri-compostera:

En una caja de tecnopor de 60 cm de largo x 30 cm de ancho x 30 cm de altura, se le hizo agujeros en la parte superior e inferior de la siguiente manera:

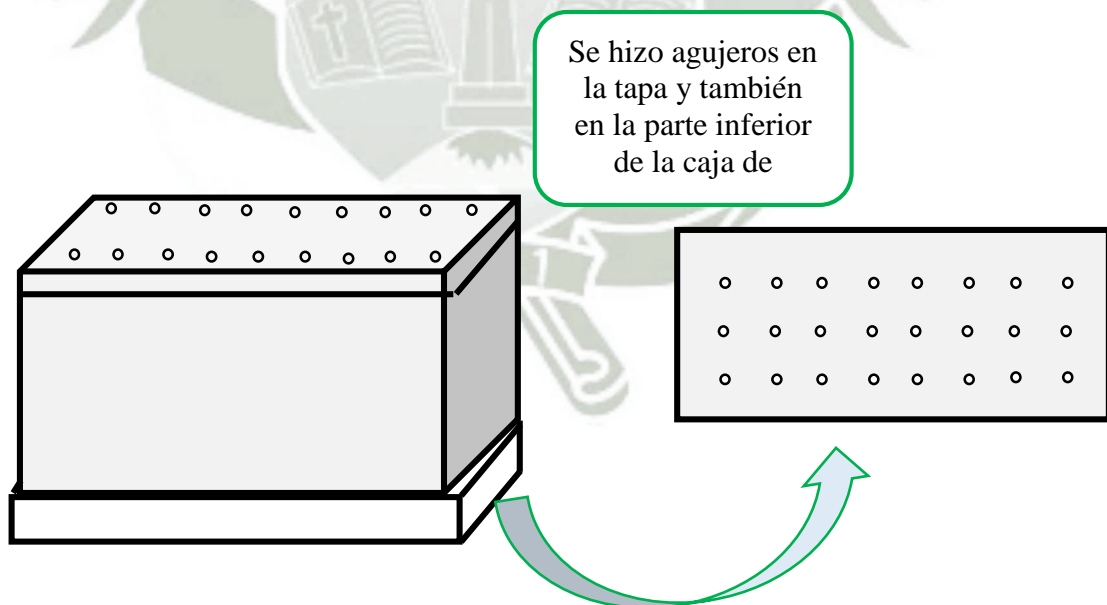


Figura 24. Bosquejo de la lombri-compostera

En la parte inferior de la caja de tecknopor se colocó un recipiente para recoger posibles fluidos a percolar.

✓ **Preparación del Humus:**

En la compostera se colocó una base de 5 cm de tierra de huerta humedecida, y sobre ésta se colocó las lombrices, se tapó la caja y se dejó por 1 día (para que las lombrices se habitúen).

Luego se procedió a colocar aproximadamente 250 g de desechos vegetales en un lado de la caja y se enterró. Este procedimiento se hizo poco a poco para que las lombrices puedan reproducirse. Se debe agregar cáscaras de huevo trituradas lo cual ayudó a que no se acidifique el humus. El tiempo que se demoró para obtener el humus fue de 2 meses y medio, se pudo observar que el humus de color casi negro.

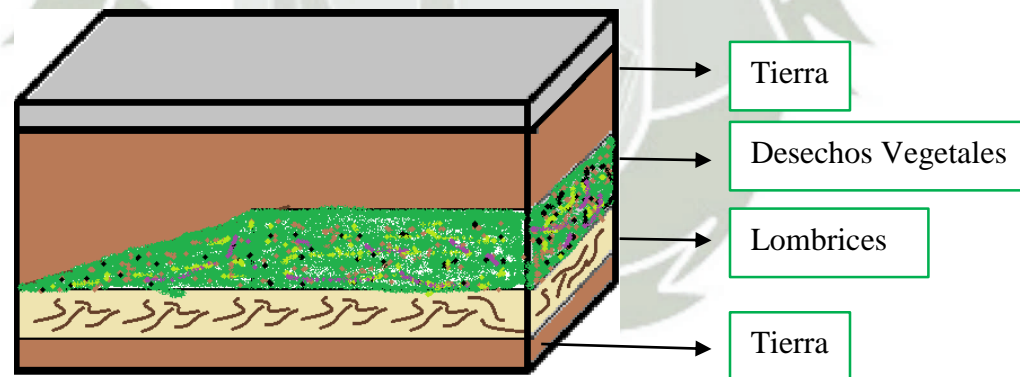


Figura 25. Divisiones de capas

✓ **Construcción de biopilas con Humus:**

✓ **Biopila Experimental 3 (Exp 3)**

En esta Biopila se mezcló 10 Kg de humus autoclavado (3 veces) a 15 psi, 121°C por 20 minutos, con Petróleo crudo, no más de 5 cm de profundidad; se inoculó con el consorcio bacteriano seleccionado, los días 0 y 20; este consorcio fue reactivado en Caldo Nutritivo. Se evaluó la influencia del consorcio bacteriano en la biodegradación de HTP's.



Figura 26. Experimental 3 - humus

✓ **Parámetros controlados en las biopilas**

En cada sistema de Biopilas se monitoreo los siguientes parámetros:

- **Temperatura:** Con el termómetro digital.
- **Humedad:** Se hizo por técnica gravimétrica cada 20 días, para mantener un nivel cercano entre 60 – 70%.
- **pH:** Se monitoreo con el uso de potenciómetro cada 20 días.
- **Concentración de HTP's:** Se recurrió a los servicios de Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.Ltda ubicado en el parque industrial Rio Seco C-1 Cerro Colorado – Arequipa, a cargo del Ing. Omar A. Juárez Soto (CIP No. 114426).

Se hizo volteos manuales diariamente y durante la aplicación de los microorganismos.

- **Recuento de Microorganismos Viables:** Se hizo el conteo antes y después de inocular.

3.3.9. Comparación del porcentaje de remoción de HTP's

Se comparó estadísticamente el porcentaje de remoción de HTP's entre las biopilas Exp 1, Exp 2 y Exp 3 con los dos tipos de sustrato (tierra y abonos orgánicos) y el testigo.

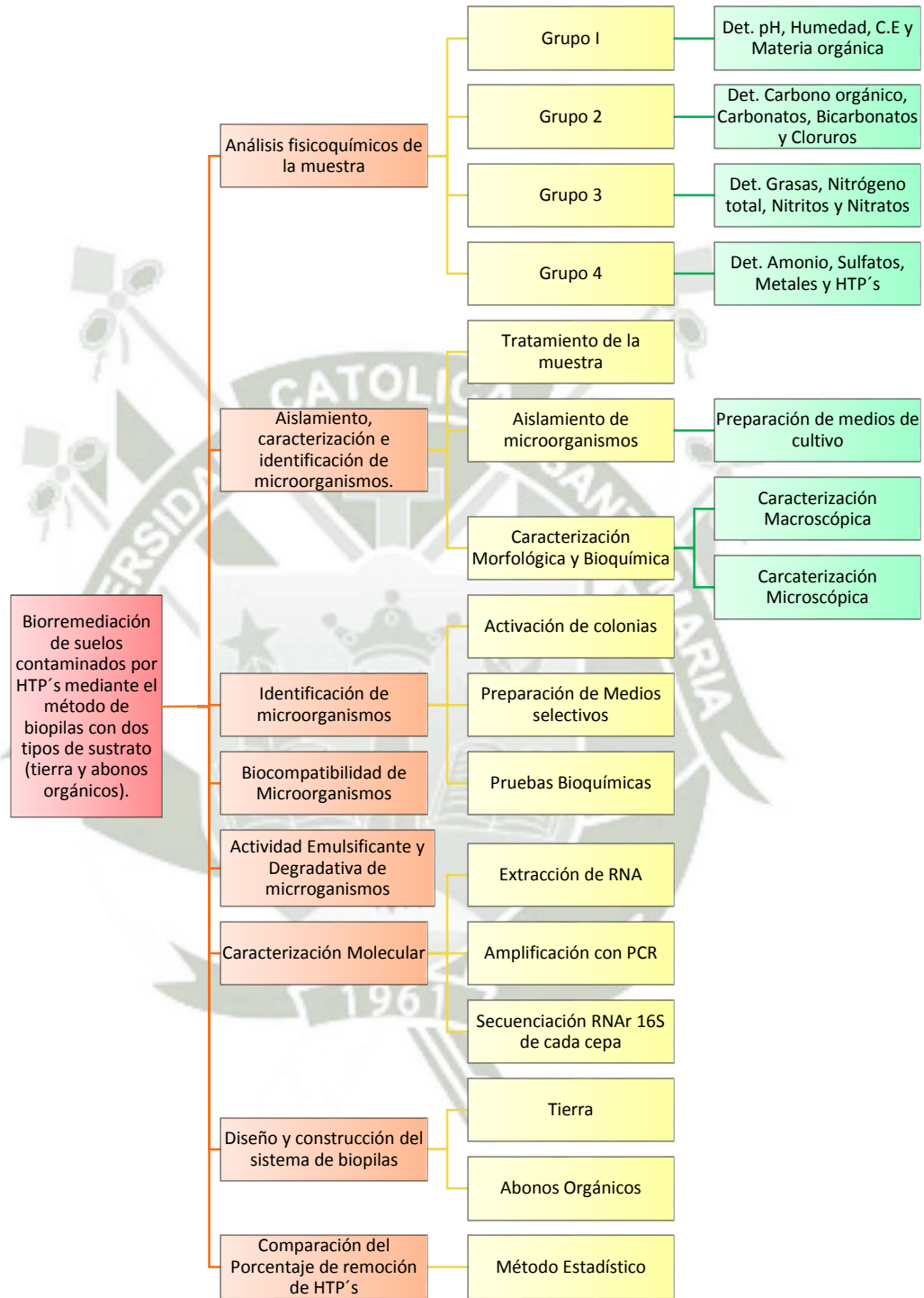
Al tratarse de un estudio en donde la variable dependiente es cuantitativa se tuvo que comparar más de dos grupos para ello se usó el ANOVA (Análisis de Varianza).

Para realizar el análisis de varianza se debe de cumplir el supuesto de que las muestras tienen varianzas iguales para ello se realizó en cada caso, primero la Prueba de Levene para ver si las varianzas son iguales y luego recién se procedió a realizar el análisis de varianza. El análisis de varianza se utilizó para contrastar la hipótesis nula de que las muestras proceden de subpoblaciones en las que la media de la variable dependiente (HTP's y Conteo bacteriano), es la misma:

$$H_0: u_1 = u_2 = \dots = u_k$$

La tabla de análisis de varianza proporciona el estadístico F para contrastar la hipótesis nula de igualdad de medias, cuanto mayor sea el estadístico F más diferenciados estarán los grupos. Si el p-valor asociado es menor que 0.05 (nuestro nivel de significación) se rechazara la hipótesis nula. El análisis de varianza indicó que existe diferencia en las medias, entonces se procedió a realizar la prueba de Tukey para averiguar en donde se encuentran estas diferencias. Para realizar todo este análisis se utilizó el programa IBM SPSS 23.0 Statistics Base (Statistical Package for the Social Science).

FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización fisicoquímica del suelo contaminado

4.1.1. Procedencia y obtención de las muestras

Las muestras se obtuvieron del “Taller Mecánica Automotriz 54” ubicado en UPIS Mercado Mayorista Mz. D, Lote 1, Zona B, Cono Norte – Cerro Colorado. Arequipa.

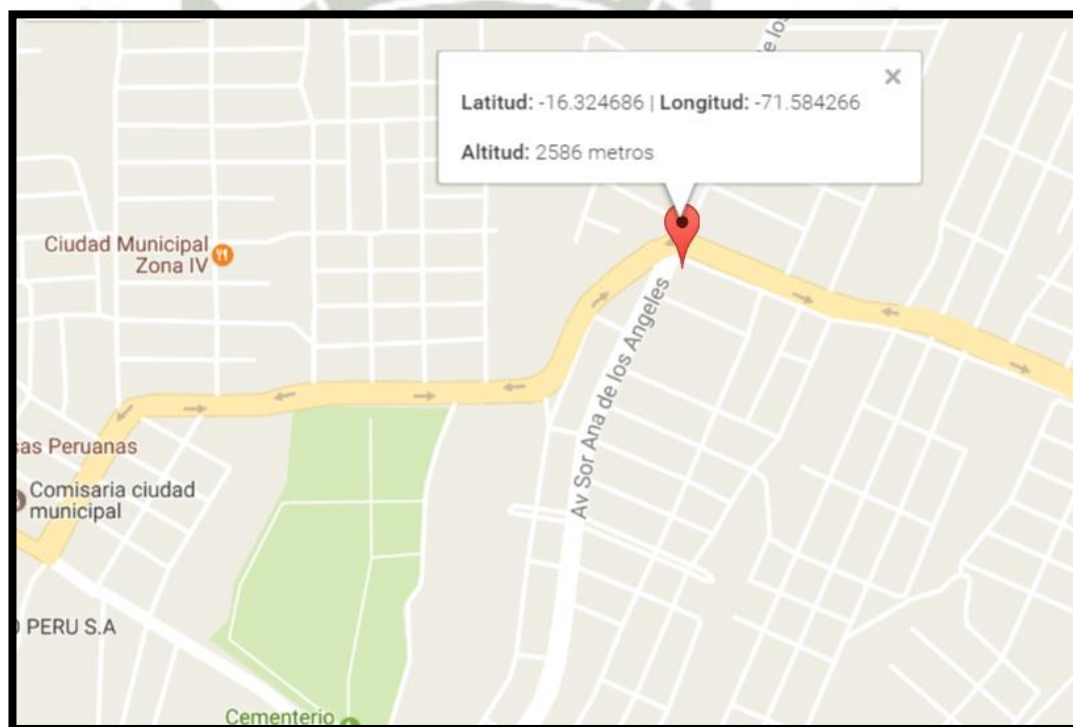


Figura 27. Coordenadas Geográficas

En el taller se escogió un área de 30 cm x 20 cm, y se tomó la muestra superficial a 0 cm, la del medio a 15 cm y la inferior a 30 cm de profundidad.



Figura 28. Divisiones de muestreo. A. Superficie: 0 cm; B. Medio: 15 cm de profundidad; C. Inferior: 30 cm de profundidad.

4.1.2. Análisis organoléptico

Para este análisis se aplicó la percepción sensorial en el laboratorio, determinando las siguientes características, que se muestran en la siguiente tabla¹¹⁵:

Tabla 16. Análisis sensorial

Divisiones	Color	Olor	Textura
Superficie	Negro	Petróleo, gasolina	Arcillosa - Grasosa
Medio	Marrón - Negro	Petróleo, gasolina	Limoso - Grasosa
Inferior	Marrón	Tierra	Arenosa - seca

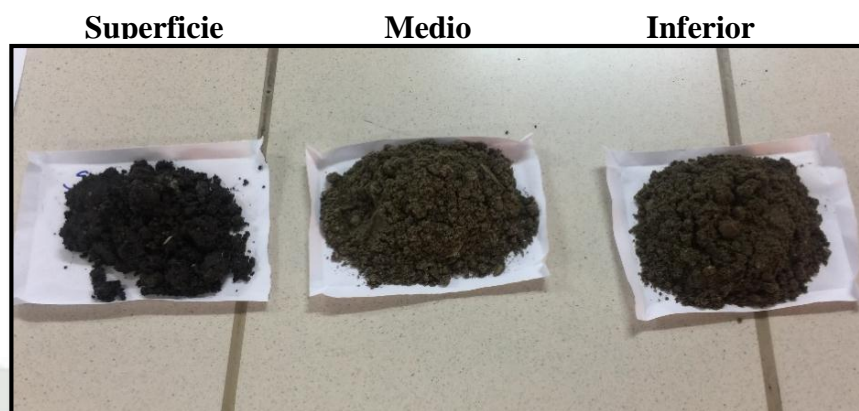


Figura 29. Percepción sensorial

Este análisis también se demostró en una investigación realizado por el Ing. Agr. Ciancaglini Nicolás, donde evaluó la textura del suelo utilizando métodos organolépticos.

4.1.3. Determinación de parámetros de las muestras

Tabla 17. Resultados de pH, Humedad, C.E y Grasas.

Parámetros	Símbolo	Unidad	Superficie	Medio	Inferior
Potencial de Hidrógeno	pH	-	7,98	8,25	8,33
Humedad	-	(%)	13.65	9.26	9.35
Conductividad Eléctrica	C.E	(μ S/cm)	358	76.6	63.5
Grasas	-	(%)	23.3	10.0	3.33



Figura 30. Muestras de pH y C.E

El **pH** permite conocer la concentración de hidrogeniones (H^+) que hay en el suelo y es un factor de mucha importancia ya que influye de gran manera en la degradación de suelos contaminados por hidrocarburos. La escala va desde 1 – 14, unos suelos neutros tienen el valor de 7, los valores menores de 7 son considerados ácidos y los valores mayores de 7 son considerados básicos. Un suelo apto tendría pH neutro, ya que tiene todos los nutrientes.

El pH afecta al crecimiento y actividad de ciertas bacterias, como en el caso de la *Pseudomona*, pero estas pueden adaptarse a condiciones extremas como lo menciona Dibble JT, Bartha R, 1979 y Hambrick GA, 1980. Cuando el pH es muy alcalino o muy ácido, el proceso de biodegradación es lento, según Stapleton RD, 1998. Para la biodegradación el rango óptimo está entre 6 – 8 pH en la investigación de Ercoli E, Gálvez J, Di Paola M y si se desea para un período largo de tiempo se recomienda que el pH sea neutro, entre 7.4 – 7.8 según Leahy JG, 1990 y Dibble JT, 1979.

En esta investigación las muestras tanto superficie, medio como inferior dieron valores entre 7.9 – 8.3, lo cual indica que el suelo es moderadamente básico y está dentro de los valores normales para el proceso de degradación de suelos contaminados.



Figura 31. Medición de pH.

La **humedad** depende principalmente de la textura, estructura y densidad del suelo, debido a que, la cantidad de agua absorbida dependerá del tamaño de los poros. De acuerdo a los tipos de suelo, se sabe, que el suelo de tipo arenoso es el que menos absorbe agua debido a su tamaño. Y en el caso del suelo de tipo arcilloso, absorberá más agua y por lo tanto será difícil de drenar según Roldán e Iturbe, 2005.

Según los resultados obtenidos de las muestras en los 3 puntos, dió un porcentaje de humedad entre 13,6 y 9,4, esto debido al tipo de suelo, ya que, el lugar de donde se obtuvieron las muestras estuvo contaminado con petróleo y aceites, lo cual impedía parcialmente la absorción del agua.



Figura 32. Determinación de humedad

La **Conductividad eléctrica** permite conocer cuantitativamente la cantidad de sales que contiene la muestra para conducir la corriente eléctrica. Los valores de Conductividad Eléctrica proveen una idea de la cantidad de fertilizante que se encuentra disponible en el medio para el crecimiento de las plantas o indica si existe acumulación de sales en el mismo.

Si la corriente se mueve fácilmente a través del sustrato, el valor de la Conductividad Eléctrica será alta, la cual, indica que la concentración de sales será mayor como lo dice Purdue University, Torres, Ariana et. col 2007.

Los resultados de las muestras, dió valores de Conductividad Eléctrica entre 60 y 360 $\mu\text{S}/\text{cm}$, esto indica que tiene una baja concentración de sales y que sirve para cultivo agrícola; según Torres, Ariana; indica que una Conductividad Eléctrica óptima tiene que ser menor a 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, el cual, facilita el manejo de la fertilización, por lo tanto, se evita problemas de fitotoxicidad en el suelo.



Figura 33. Medición de C.E

La **grasa** se analiza con el objetivo de saber el grado de contaminación del suelo por usos industriales, mineras, humanos, etc. Aquí se mide un grupo de sustancias con las mismas características fisicoquímicas. El análisis de las grasas incluye a jabones, ceras, hidrocarburos de bajo y de alto peso molecular, ya sea de origen mineral o industrial, que abarca el uso de la gasolina, aceites lubricantes y entre otros combustibles. El estudio de impacto ambiental (EsIAD, 2013) que realizó en la subestación Sushufindi sobre

concentraciones de grasas demuestra que los niveles actuales está dentro de los límites máximos permisibles hasta un 25%.

El resultado obtenido, en el presente trabajo fue de 23%, lo cual indica que la concentración de grasas es próximo a alcanzar los límites máximos permisibles (25%), porque las muestras provienen de un taller mecánico, allí se observó gran cantidad de aceites lubricantes y gasolina derramada, contaminando el suelo.



Figura 34. Análisis de grasas

Tabla 18. Resultados de Carbono Orgánico, Materia Orgánica, Carbonatos, Bicarbonatos y Cloruros.

Parámetros	Símbolo	Unidad	Superficie	Medio	Inferior	Blanco
Carbono Orgánico	C.O	(%)	1.1	0.2	0.1	-
Materia Orgánica	M.O	(%)	1.9	0.3	0.2	-
Carbonatos	-	mEq/L	1.2	1.2	1.2	0.8
Bicarbonatos	-	mEq/L	2.8	1.0	0.4	0.2
Cloruros	-	mEq/L	0.9	0.7	0.4	0.4

El **Carbono Orgánico** es el porcentaje de carbono presente en los compuestos orgánicos de suelo, es el elemento más importante que forma la **Materia Orgánica** del suelo. El Carbono Orgánico es parte de la naturaleza en forma de residuos orgánicos y se da por el balance entre el material orgánico fresco y la salida de carbono del suelo en forma de CO_2 a la atmósfera, erosión y lixiviación según una investigación realizada por el Ing. Agr. Carrerira, Daniel acerca del método Walkley & Black para Carbono orgánico y la investigación de Gonzalo de Las Salas, 1979.

En los resultados obtenidos se observa que mientras mayor sea el porcentaje de materia orgánica, mayor será el porcentaje de carbono orgánico. En la muestra superficial se observa un porcentaje mayor, debido a que, tiene mayor cantidad de residuos orgánicos.



Figura 35. Determinación de Carbono Orgánico y Materia Orgánica

Los **Carbonatos** y los **Bicarbonatos**, están presentes como sales de Na, en suelos alcalinos, mientras que el bicarbonato solo es un componente normal de los suelos salinos. Un suelo con elevada concentración de carbonatos tendrá un pH neutro o parcialmente alcalino, mientras que un suelo con baja concentración de carbonatos tendrá un pH ácido según la investigación de la empresa de Lenntech.

Los resultados obtenidos indican que los carbonatos y bicarbonatos se relacionan con el pH ya que oscilan entre un pH neutro y alcalino, los resultados se encuentran dentro del límite permisible y que la tierra es apta para cultivo, en cuento a la concentración de sales.



Figura 36. Determinación de Carbonatos



Figura 37. Determinación de Bicarbonatos

Los **Cloruros**, son esenciales en suelos para el rendimiento de los cultivos, son regulados de forma natural, ya que depende mucho de la estructura de los suelos, porque su comportamiento es similar al de los nitratos, según La Gestión y conservación de suelos,

Muñoz Andrés, Vicenta, 2017 en suelos arcillosos, el cloruro es un anión fácilmente desplazable por otros y que se pueden encontrar hasta en elementos traza y como NaCl. En los resultados obtenidos dio un valor mínimo de cloruros ya que la textura de los suelos era arcillosa y este tipo de suelos no tiene una buena absorción de estos iones.

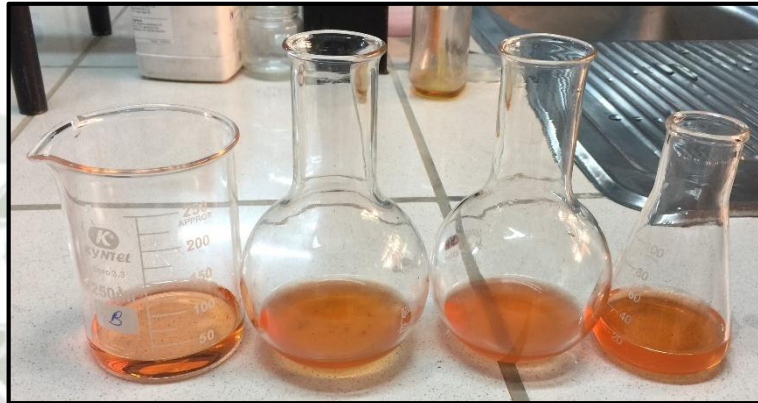


Figura 38. Determinación de Cloruros

Tabla 19. Resultados de N, NO_3^- , NO_2^- , $\text{N}^\circ\text{NH}_4$ y $\text{SO}_4^{=}$

Parámetros	Símbolo	Unidad	Superficie	Medio	Inferior
Nitrógeno Total	N_2	mg/Kg	16,183	9,728	11,707
Amonio	$\text{N}^\circ\text{NH}_4$	mg/Kg	8.93	4.77	5.48
Nitritos	NO_2^-	mg/Kg	0,270	0,23	0,170
Nitratos	NO_3^-	mg/Kg	31.6	21.5	27.2
Sulfatos	$\text{SO}_4^{=}$	mg/Kg	1844	98	206

El ciclo del **Nitrógeno Total** empieza con la Amonificación, gracias a bacterias como *Acetobacter spp* y *Clostridium spp*, dando **Amonio**, luego se da una Nitrosación por los *Nitrosomas spp*, dando **Nitrito**, seguidamente se da una Nitratación por *Nitrobacter spp*, dando **Nitrato**, por último, se da una Desnitrificación por *Bacillus spp* y *Pseudomonas spp*, para finalmente liberarse en la atmosfera según en el Manual técnico de la

organización “Food and Agriculture Organization of the United Nations” – 1995 y El ciclo del nitrógeno en ecosistemas agrícolas, Fernando O. García – 1996.

Tabla: 66 “Clasificación según el Nitrógeno total (%)”.

Nitrógeno total (%)	Clasificación
Mayor de 0,18 %	Alto
De 0,15 – 0,18 %	L. Alto
De 0,10 – 0,15 %	Normal
De 0,08 – 0,10 %	L. Bajo
De 0,05 – 0,08 %	Bajo
Menor de 0,05 %	Muy Bajo

Fuente: <http://www.agroinformación.com>

Los **sulfatos** contribuyen al diagnóstico de la disponibilidad del nutriente en el suelo, para esto, el azufre presente en la materia orgánica de los suelos pasa por un proceso conocido como Mineralización, que gracias a los microorganismos se convierte en azufre según Hans W. Fassbender en su libro de *Química de Suelos*. En los resultados obtenidos, los valores indican que el suelo tiene la cantidad necesaria de nitrógeno, por lo tanto de amonio, nitrito, así como de sulfatos, ya que no existe un estándar que indique un valor fijo. (Anexo 03 y Anexo 04).

Tabla 20. Resultados de Metales Totales

Metales	Símbolo	Unidad	Superficie	Medio	Inferior
Aluminio	Al	mg/Kg	5332.59	4219.741	5896.349
Antimonio	Sb	mg/Kg	3.537626	0.533004	^a < 0.049
Arsénico	As	mg/Kg	^a < 0.12	^a < 0.12	^a < 0.12
Bario	Ba	mg/Kg	146.3375	104.6998	118.9902
Berilio	Be	mg/Kg	^a < 0.0079	^a < 0.0079	^a < 0.0079
Boro	B	mg/Kg	^a < 0.53	^a < 0.53	^a < 0.53
Cadmio	Cd	mg/Kg	2.585821	1.971523	2.145019
Calcio	Ca	mg/Kg	> 10 000	3080.53	2038.079
Cesio	Ce	mg/Kg	19.00961	28.2415	25.85939
Cobalto	Co	mg/Kg	3.631598	4.553412	5.804248

Cobre	Cu	mg/Kg	145.9836	29.46378	27.41977
Cromo	Cr	mg/Kg	20.93784	4.364898	4.500583
Estaño	Sn	mg/Kg	5.255968	^a < 0.085	^a < 0.085
Estroncio	Sr	mg/Kg	78.57108	36.58115	33.57047
Fósforo	P	mg/Kg	1965.781	656.8402	636.2423
Hierro	Fe	mg/Kg	9264.954	8076.591	9187.807
Litio	Li	mg/Kg	5.925039	2.033192	1.731962
Magnesio	Mg	mg/Kg	2148.35	1528.996	1615.502
Manganeso	Mn	mg/Kg	130.3987	90.21163	126.5922
Mercurio	Hg	mg/Kg	0.984602	^a < 0.041	^a < 0.041
Molibdeno	Mo	mg/Kg	5.853342	^a < 0.038	^a < 0.038
Níquel	Ni	mg/Kg	17.86884	4.283312	4.807078
Óxido de Silicio	SiO ₂	mg/Kg	856.3328	441.9617	515.3107
Potasio	K	mg/Kg	1214.057	1212.536	1479.147
Plata	Ag	mg/Kg	^a < 0.24	^a < 0.24	^a < 0.24
Plomo	Pb	mg/Kg	81.06188	5.234208	3.452208
Selenio	Se	mg/Kg	^a < 0.2	^a < 0.2	^a < 0.2
Sodio	Na	mg/Kg	2223.038	399.7839	507.2982
Titanio	Ti	mg/Kg	275.5306	559.0129	705.4735
Tolueno	Tl	mg/Kg	^a < 0.13	^a < 0.13	^a < 0.13
Vanadio	V	mg/Kg	13.71943	26.03386	30.06449
Zinc	Zn	mg/Kg	607.0871	26.85932	15.36879

^a < Valor numérico” = Límite de detección del método

Los metales en los suelos son importantes para el desarrollo de los cultivos, siempre y cuando se encuentre dentro de los estándares permitidos, y si se encuentran en

concentraciones elevadas, podrían ser tóxicos para el suelo y por lo tanto para el desarrollo de cultivos, así mismo para la salud humana.

Según el Decreto Supremo N°002-2013-MINAM (Anexo 05), las concentraciones de **Arsénico, Bario, Cadmio, Mercurio y Plomo**; se encuentran dentro de los estándares permitidos; mientras que el **Cromo**, sobrepasa el estándar permitido y según el EPA 200.7. REVISION 4.4; las concentraciones del **Calcio, Cobre, Níquel y Zinc**; sobrepasan el estándar permitido. (Anexo 04).

Tabla 21. Resultados de HTP's

Parámetro	Unidad	Superficie	Medio	Inferior
HTP's	mg/Kg	75979.3	733.1	257.5

La presencia de Hidrocarburos en suelos siempre va a existir, ya sea, en mínimas cantidades, debido al uso industrial, agrícola, comercial, minero y residencial.

Según el Decreto Supremo N°002-2013-MINAM (Anexo 05), la Concentración de **Hidrocarburos** en la muestra superficial sobrepasa el estándar permitido, mientras que en las muestras de medio e inferior se encuentran dentro del estándar permitido. (Anexo 04).

4.2. Aislamiento, caracterización e identificación de microorganismos

4.2.1. Aislamiento y caracterización de cepas microbianas

Se aisló en diferentes medios de cultivo, se trabajó con cepas bacterianas de la parte superficial, ya que el crecimiento bacteriano fue igual al de las placas del medio e inferior como lo dice Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case en el libro "Introducción a la Microbiología" – 2007.

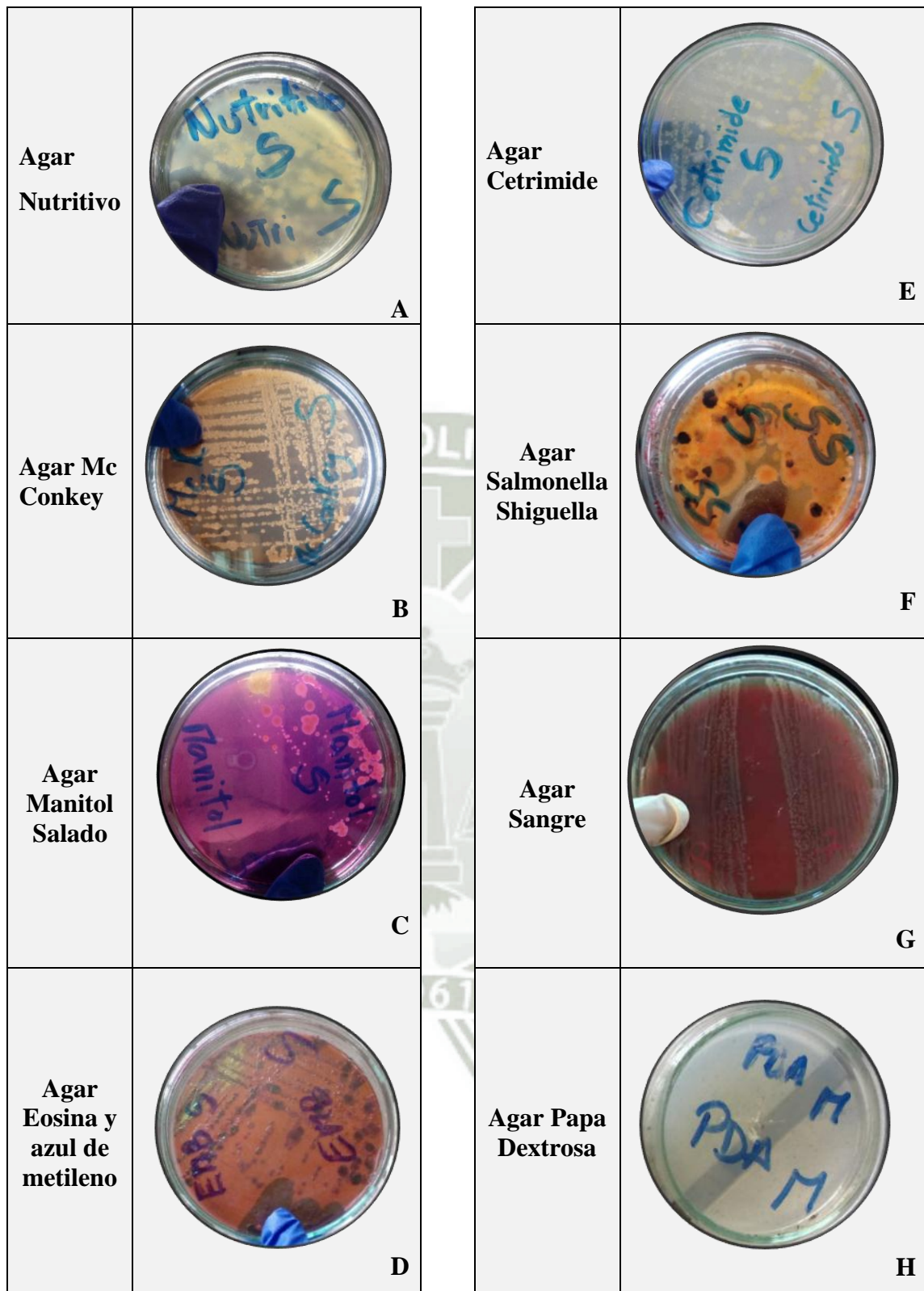
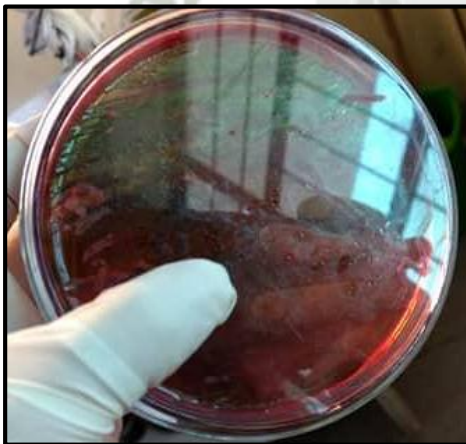


Figura 39. Crecimiento microbiano en distintos Medios de Cultivo.

En la **Figura 39**, se observan placas de cultivo con distintos crecimientos microbianos; **A**: se observa un crecimiento general en toda la placa de colonias pequeñas y grandes; **B**: crecimiento de colonias uniformes de un solo tipo. **C**: crecimiento escaso de colonias. **D**: colonias con brillo metálico y colonias rojas pequeñas. **E**: colonias grandes redondas con pigmentación amarilla, colonias grandes redondas uniformes y colonias pequeñas redondas uniformes. **F**: colonias semimarrones con centro negro y colonias semitransparentes. **G**: colonias color plata opaco y **H**: sin crecimiento.

- **Selección de cepas**

Se empleó 9 cepas, para ello se tuvo en cuenta las características macroscópicas de las colonias en cada placa mostrada en la **Tabla 25**; se aisló las colonias de los Medios EMB, Mc Conkey, Manitol Salado y Cetrimide ; a medios selectivos (Medio EMB, Medio Manitol Salado, Medio Cetrimide y Medio Nutritivo) para su crecimiento.



A



B

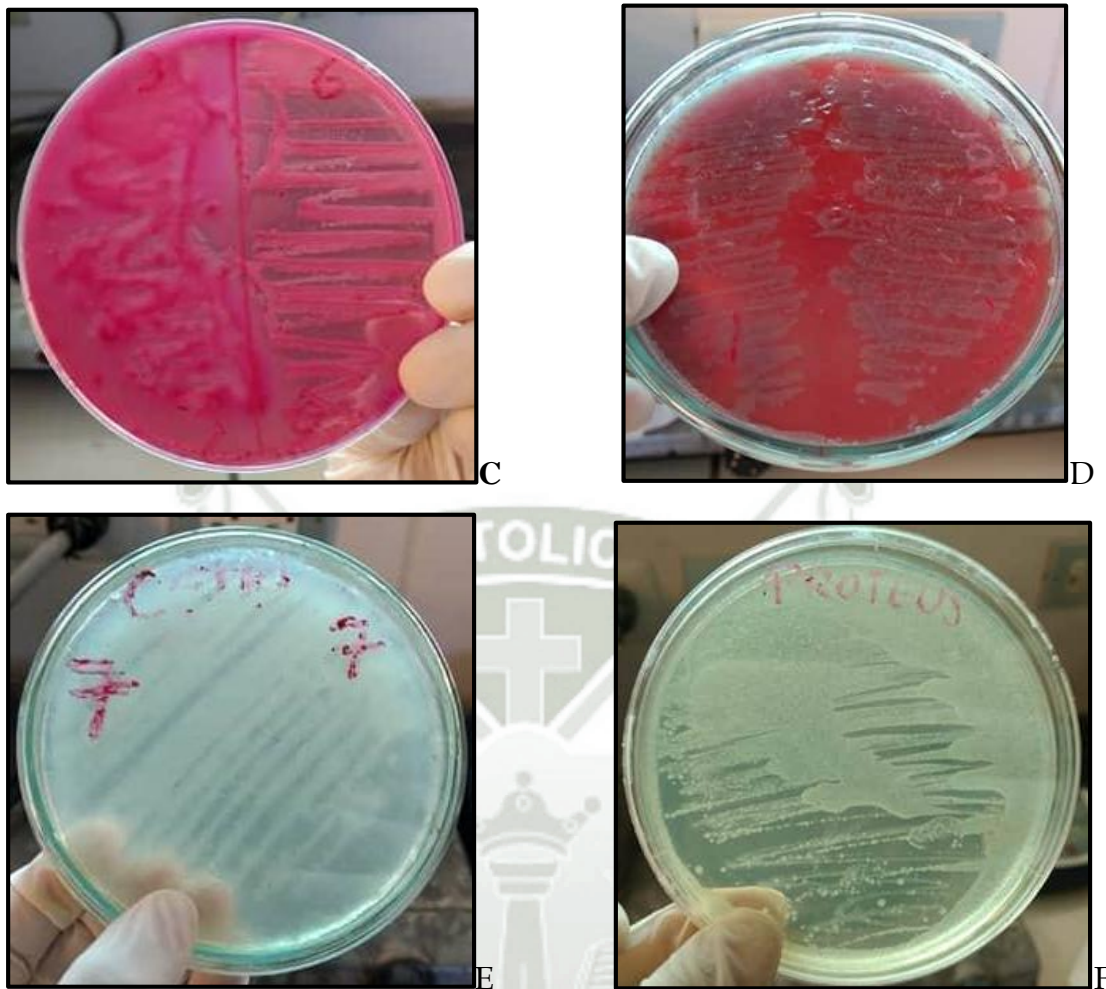


Figura 40. Medios Selectivos, A: Medio EMB, B: Medio Manitol Salado, C: Medio Mc Conkey, D: Medio Sangre, E: Medio Cetrinimide y F: Medio Nutritivo.

Caracterización Macroscópica de las Cepas Seleccionadas

En la **Figura 40**, se observa fotos de las 9 cepas que se usó para este proyecto, cada una de las cepas mostradas fueron sembradas en medios selectivos, dado que estas cepas son las que “se sospechaba”; para su posterior identificación.

Pero antes se realizó la descripción morfológica de cada colonia, teniendo en cuenta los siguientes parámetros: forma, superficie, elevación, borde, tamaño, color, lustre y

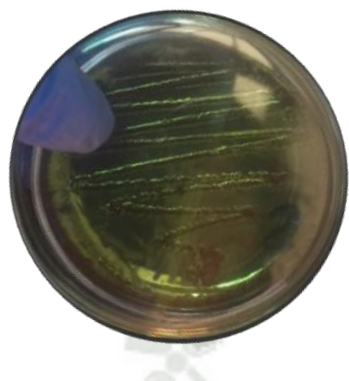

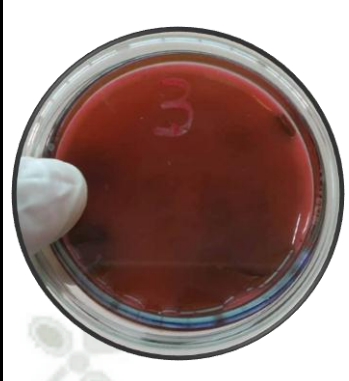






consistencia, esta descripción se encuentra en la **tabla 25** según Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case en su libro “Introducción a la Microbiología”– 2007.

Tabla 22. Descripción morfológica de las 9 cepas.

Parámetros	Forma	Borde	Elevación	Color	Superficie	Tamaño	Lustre	Consistencia
CEPA 1	Irregular	Irregular	Convexa	Verde metálico	Lisa	pequeño	brillante	No mucoide
CEPA 2	Irregular	Irregular	Convexa	Blanco	Rugosa	Mediano	No brillante	No mucoide
CEPA 3	Irregular	Irregular	Convexa	Rosado Opaco	Lisa	Mediano	No brillante	No mucoide
CEPA 4	Irregular	Irregular	Convexa	Blanco	Lisa	Mediano	No brillante	No mucoide
CEPA 5	Redonda	Entera	Convexa	Blanco	Semirugoso	Grande	No brillante	No mucoide
CEPA 6	Irregular	Irregular	Convexa	Blanco	Lisa	Mediano	No brillante	No mucoide
CEPA 7	Irregular	Irregular	Convexa	Blanco	Lisa	Pequeño	No brillante	No mucoide
CEPA 8	Regular	Irregular	Convexa	Rojo	Lisa	Pequeño	No brillante	No mucoide
CEPA 9	Regular	Irregular	Convexa	Blanco	Lisa	Pequeño	No brillante	No mucoide

En la **Tabla 26**, se describió a las colonias de las 9 cepas según su forma, borde, elevación, color, superficie, tamaño, lustre y consistencia como lo indica M, Pérez, M. Mota en el libro sobre “Morfología y estructura bacteriana”.

Tabla 23. Cepas seleccionadas

		
CEPA 1	CEPA 2	CEPA 3
		
CEPA 4	CEPA 5	CEPA 6
		
CEPA 7	CEPA 8	CEPA 9

Caracterización microscópica

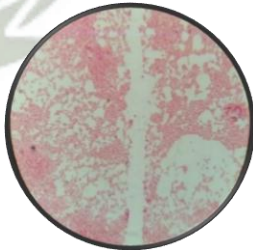
Se hizo la tinción Gram, y luego se observó en el microscopio de menor a mayor aumento.

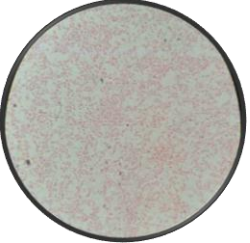
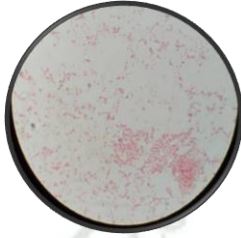
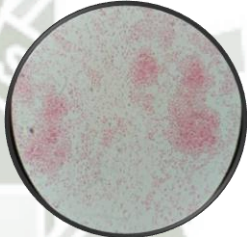
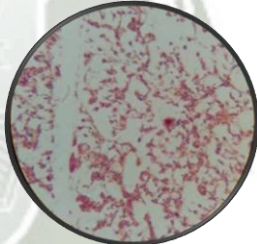
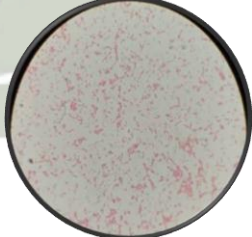
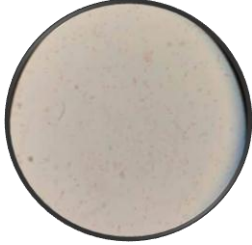


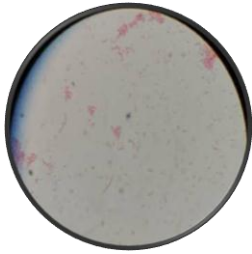
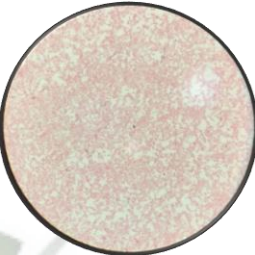
Figura 41. Tinción Gram

La mayoría de las cepas aisladas presento características típicas de bacterias Gram negativas según el Manual Práctico de Microbiología, 3ra Edición, Gamazo, Carlos et. col Días, Ramón, 2005.

Tabla 24. Principales características microscópicas de las cepas.

CEPAS	CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS	OBSERVACION MICROSCOPICA A 100X
CEPA 1	Bacterias Gram negativas. Bacilos en cadenas pequeñas de 2 en 2, la mayoría.	

<p>CEPA 2</p>	<p>Bacterias Gram negativas. Bacilos con flagelos.</p>	
<p>CEPA 3</p>	<p>Bacterias Gram negativas. Bacilos alargados.</p>	
<p>CEPA 4</p>	<p>Bacterias Gram negativas. Bacilos alargados.</p>	
<p>CEPA 5</p>	<p>Bacterias Gram positivas Bacilos muy alargados.</p>	
<p>CEPA 6</p>	<p>Bacterias Gram negativas. Bacilos alargados con flagelos.</p>	
<p>CEPA 7</p>	<p>Bacterias Gram negativas. Bacilos con flagelos.</p>	

<p>CEPA 8</p>	<p>Bacterias Gram negativas. Bacilos alargados</p>	
<p>CEPA 9</p>	<p>Bacterias Gram negativas. Bacilos alargados.</p>	

4.2.2. Identificación Bioquímica

Para realizar la identificación de las cepas microbianas se empleó una batería de pruebas bioquímicas para ver las diferentes características de los microorganismos como lo indica el Manual Práctico de Microbiología, 3ra Edición, Gamazo, Carlos et. col Días, Ramón, 2005.

Tabla 25. Batería de la Cepa 1.






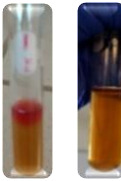
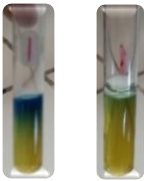
CEPA 1			
S I M	Producción de H ₂ S	-	
	Formación de Indol	+	
	Motilidad	+	
T S I	Fermentación Glu, Lac, Sac	A/A	
	Producción de H ₂ S	-	
	Producción de Gas	+	
C.S	Degradación de Citrato	-	
LIA	Descarboxilación lisina	K/K	
UREA	Hidrolización de urea	-	
MR VP	Prueba Rojo Metilo	+	
	Prueba de Voges -Proskauer	-	
O F	Oxidación	+	
	Fermentación	+	

Tabla 26. Batería de la Cepa 2.






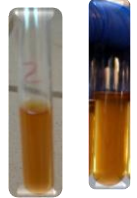
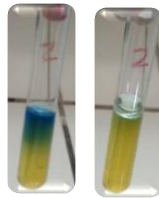
CEPA 2			
S I M	Producción de H ₂ S	-	
	Formación de Indol	-	
	Motilidad	+	
T S I	Fermentación Glucosa	K/A	
	Producción de H ₂ S	-	
	Producción de Gas	+	
C.S	Degradación de Citrato	+	
LIA	Descarboxilación lisina	K/A	
UREA	Hidrolización de urea	-	
MR VP	Prueba Rojo Metilo	-	
	Prueba de Voges -Proskauer	-	
O F	Oxidación	+	
	Fermentación	+	

Tabla 27. Batería de la Cepa 3.






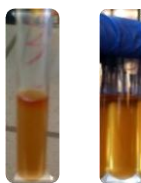
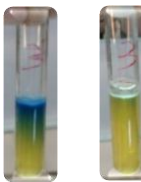
CEPA 3			
S I M	Producción de H ₂ S	-	
	Formación de Indol	+	
	Motilidad	-	
T S I	Fermentación Glu, Lac, Sac	K/A	
	Producción de H ₂ S	-	
	Producción de Gas	+	
C.S	Degradación de Citrato	+	
LIA	Descarboxilación lisina	K/A	
UREA	Hidrolización de urea	+	
MR VP	Prueba Rojo Metilo	+	
	Prueba de Voges -Proskauer	-	
O F	Oxidación	+	
	Fermentación	+	

Tabla 28. Batería de la Cepa 4.







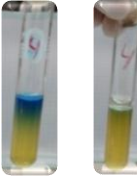
CEPA 4			
S I M	Producción de H ₂ S	-	
	Formación de Indol	-	
	Motilidad	-	
T S I	Fermentación Glu, Lac, Sac	K/A	
	Producción de H ₂ S	+	
	Producción de Gas	+	
C.S	Degradación de Citrato	+	
LIA	Descarboxilación lisina	K/A	
UREA	Hidrolización de urea	+	
MR VP	Prueba Rojo Metilo	+	
	Prueba de Voges -Proskauer	-	
O F	Oxidación	+	
	Fermentación	+	

Tabla 29. Batería de la Cepa 5






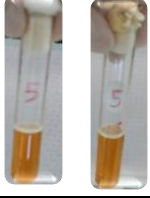
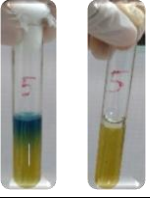
CEPA 5			
S I M	Producción de H ₂ S	-	
	Formación de Indol	-	
	Motilidad	+	
T S I	Fermentación Glu, Lac, Sac	K/A	
	Producción de H ₂ S	-	
	Producción de Gas	-	
C.S	Degradación de Citrato	+	
LIA	Descarboxilación lisina	K/A	
UREA	Hidrolización de urea	-	
MR VP	Prueba Rojo Metilo	-	
	Prueba de Voges -Proskauer	-	
O F	Oxidación	+	
	Fermentación	+	

Tabla 30. Batería de la Cepa 6.






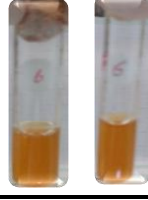
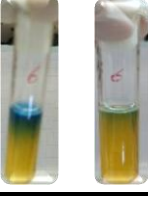
CEPA 6			
S I M	Producción de H ₂ S	-	
	Formación de Indol	+	
	Motilidad	+	
T S I	Fermentación Glu, Lac, Sac	K/K	
	Producción de H ₂ S	+	
	Producción de Gas	+	
C.S	Degradación de Citrato	+	
LIA	Descarboxilación lisina	K/K	
UREA	Hidrolización de urea	+	
MR VP	Prueba Rojo Metilo	-	
	Prueba de Voges -Proskauer	-	
O F	Oxidación	+	
	Fermentación	+	

Tabla 31. Batería de la Cepa 7.






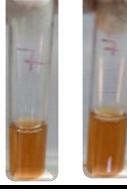
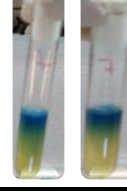
CEPA 7			
S I M	Producción de H ₂ S	+/-	
	Formación de Indol	+	
	Motilidad	-	
T S I	Fermentación Glu, Lac, Sac	A/A	
	Producción de H ₂ S	+	
	Producción de Gas	+	
C.S	Degradación de Citrato	+	
LIA	Descarboxilación lisina	K/K	
UREA	Hidrolización de urea	+	
MR VP	Prueba Rojo Metilo	-	
	Prueba de Voges -Proskauer	-	
O F	Oxidación	+	
	Fermentación	+	

Tabla 32. Batería de la Cepa 8.






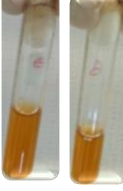
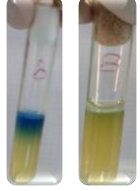
CEPA 8			
S I M	Producción de H ₂ S	-	
	Formación de Indol	+	
	Motilidad	-	
T S I	Fermentación Glu, Lac, Sac	A/A	
	Producción de H ₂ S	+	
	Producción de Gas	+	
C.S	Degradación de Citrato	+	
LIA	Descarboxilación lisina	K/K	
UREA	Hidrolización de urea	+	
MR VP	Prueba Rojo Metilo	-	
	Prueba de Voges -Proskauer	-	
O F	Oxidación	+	
	Fermentación	+	

Tabla 33. Batería de la Cepa 9.






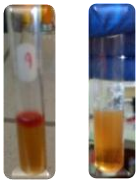
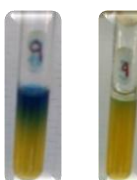
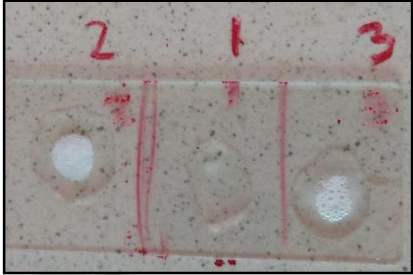

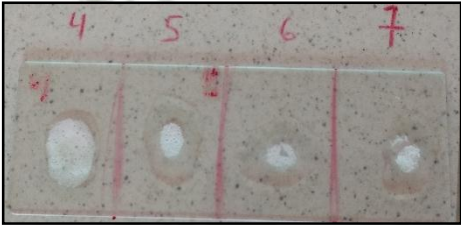
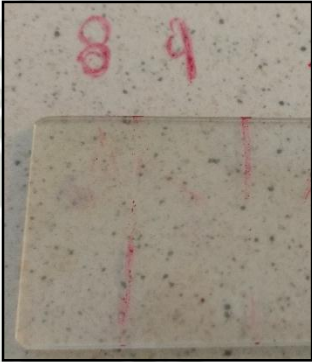

CEPA 9			
S I M	Producción de H ₂ S	+	
	Formación de Indol	+	
	Motilidad	+	
T S I	Fermentación Glu, Lac, Sac	A/A	
	Producción de H ₂ S	+	
	Producción de Gas	-	
C.S	Degradación de Cítrato	-	
LIA	Descarboxilación lisina	R/A	
UREA	Hidrolización de urea	+	
MR VP	Prueba Rojo Metilo	+	
	Prueba de Voges -Proskauer	-	
O F	Oxidación	+	
	Fermentación	+	

Tabla 34. Pruebas de Catalasa y Oxidasa de las cepas

CATALASA	OXIDASA
	
	
	

En las **Tablas 29 – 37**, se observan baterías de pruebas bioquímicas, de las 9 cepas, en estas se observó producción de CO₂, H₂S, motilidad, indol, fermentación de lactosa, catalasa, oxidasa, etc, como lo indica en el Manual Práctico de Microbiología, 3ra Edición, Gamazo, Carlos et. col Días, Ramón, 2005.

De acuerdo al Manual Práctico de Microbiología, 3ra Edición, Gamazo, Carlos et. col Días, Ramón, 2005, los resultados que se obtuvo mediante la caracterización macroscópica, microscópica y las pruebas bioquímicas para la identificación de las 9 cepas que fueron aisladas de las muestras de tierra, se infirió el género más no la especie de estas, como se muestra en la **Tabla 38**:

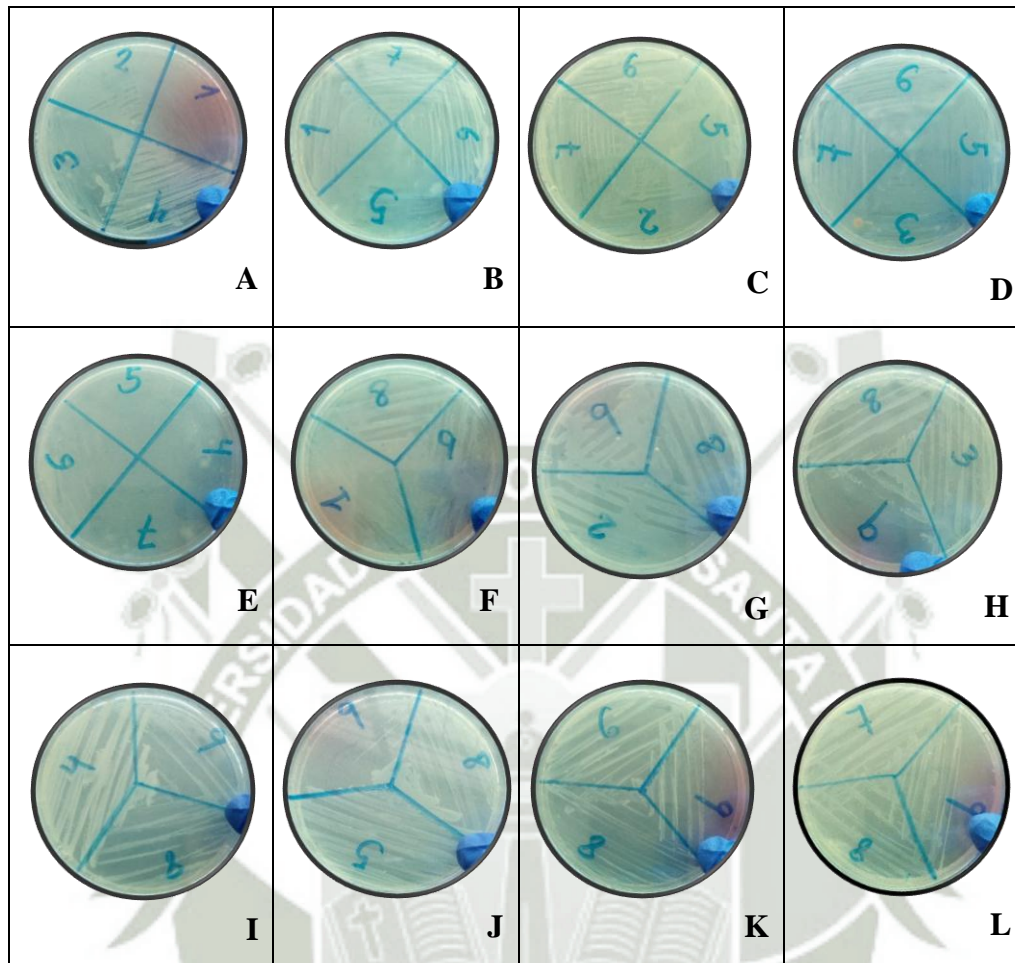
Tabla 35. Identificación de microorganismos

Cepa	Nombre
1	<i>Escherichia coli</i>
2	<i>Hafnia</i>
3	<i>Enterobacter spp.</i>
4	<i>Bacillus spp.</i>
5	<i>Bacillus spp.</i>
6	<i>Pseudomona spp.</i>
7	<i>Citrobacter spp.</i>
8	<i>Aeromona spp.</i>
9	<i>Proteus spp.</i>

4.3. Biocompatibilidad de microorganismos

La biocompatibilidad se realizó para ver si los microorganismos eran capaces de coexistir en un mismo medio sin inhibir el crecimiento entre ellos.

Tabla 36. Compatibilidad de Cepas.



En la **tabla 39**, se observó que después de 48 horas de convivencia, las 9 cepas son compatibles entre sí, sobreviviendo en el medio de cultivo sin haberse contaminado con otras colonias que no se hayan sembrado. Las cepas no se inhibieron entre sí debido al neutralismo que existe entre ellos, ya que las cepas tienen la misma función o cuyas funciones coincidan parcialmente¹²⁰, según el trabajo de investigación de Julieth A. Carrillo y col. sobre la compatibilidad de microorganismos para optimizar cultivos. Gracias a estas funciones similares que tienen las cepas, permitió trabajar con todas, como un consorcio bacteriano para llevar a cabo la biorremediación con el sistema de biopilas usando el sustrato “tierra” y “abonos orgánicos”.

4.4. Actividad Emulsificante de los microorganismos

Esta prueba se realizó con el propósito de evaluar la capacidad que tienen los microorganismos de producir emulsificante de petróleo en agua.



Figura 42. Lectura en el Espectrofotómetro.

Según Goldman y col. (1982), se convirtió la absorbancia en Unidad de Actividad Emulsificante por mililitro (UAE/mL), siendo 0.816 de Abs. Equivalente a 1 UAE/mL.

Tabla 37. Actividad Emulsificante

Numero	Microorganismo	Abs.	UAE/mL
1	<i>Escherichia coli</i>	0.691	0.84
2	<i>Hafnia</i>	1.485	1.81
3	<i>Enterobacter spp.</i>	1.616	1.98
4	<i>Bacillus spp.</i>	0.872	1.06
5	<i>Bacillus spp.</i>	1.638	2.00
6	<i>Pseudomona spp.</i>	1.173	1.43
7	<i>Citrobacter spp.</i>	1.735	2.12
8	<i>Aeromona spp.</i>	0.722	0.88
9	<i>Proteus spp.</i>	1.893	2.31

En la investigación de la “Biodegradación de crudo de petróleo en Terrarios” hecho por Escalante Guzmán, Rocío Miluska, la actividad emulsificante fluctuó entre 0.75 UAE/mL

y 3.66 UAE/mL de las bacterias exógenas aisladas de la Refinería “La Pampilla”, lo cual le fue óptimo para su investigación. En la **Tabla 40**, se observa la actividad emulsificante entre 0.84 UAE/mL y 2.31 UAE/MI, entonces esto indicó que las bacterias tuvieron buena actividad de emulsificación y luego se realizó la prueba de la actividad degradativa.

4.5. Capacidad Degradativa de los microorganismos

Esta prueba se realizó con el propósito de evaluar la capacidad del microorganismo de degradar los Hidrocarburos de Petróleo, se realizó esta prueba a las 9 cepas, según Mills y col. 1978.

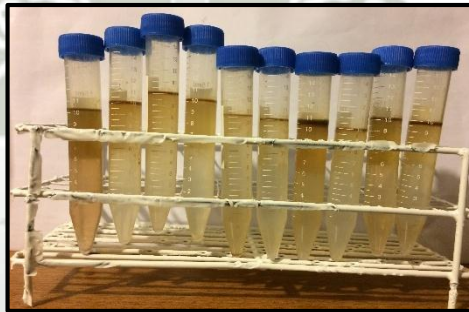


Figura 43. Lectura con Escala de Mc. Farland.

En las lecturas se tomó en cuenta la turbidez comparada con la Escala de Mac. Farland; una turbidez de 2+, indicó una población aproximadamente de 6×10^8 m.o/mL, en la Escala de turbidez de Mc. Farland corresponde a un crecimiento regular; una turbidez de 3+, indicó una población aproximadamente de 9×10^8 m.o/mL corresponde a un crecimiento bueno y una turbidez de 5+, indicó una población aproximadamente de 15×10^8 m.o/mL corresponde a un crecimiento muy bueno.

Tabla 38. Capacidad Degradativa.

Numero	Microorganismo	A.D.
1	<i>Escherichia coli</i>	2+
2	<i>Hafnia</i>	2+
3	<i>Enterobacter spp.</i>	3+
4	<i>Bacillus spp.</i>	2+
5	<i>Bacillus spp.</i>	3+
6	<i>Pseudomona spp.</i>	2+
7	<i>Citrobacter spp.</i>	3+
8	<i>Aeromona spp.</i>	2+
9	<i>Proteus spp.</i>	3+

Según, Escalante Guzmán, Rocío Miluska en su trabajo de Biodegradación de crudo de petróleo, la actividad degradativa alcanzó un valor máximo de (3+) y uno mínimo de (2+) de las bacterias exógenas aisladas de la Refinería “La Pampilla”. En la **Tabla 41**, se observó la capacidad degradativa de las cepas exógenas iguales a la investigación mencionada anteriormente.

4.6. Caracterización Molecular de Cepas Seleccionadas

Después de realizar la Actividad Emulsificante y la Capacidad Degradativa, se seleccionó 4 cepas que presentaron mayor y mejor resultado de las pruebas mencionadas anteriormente.

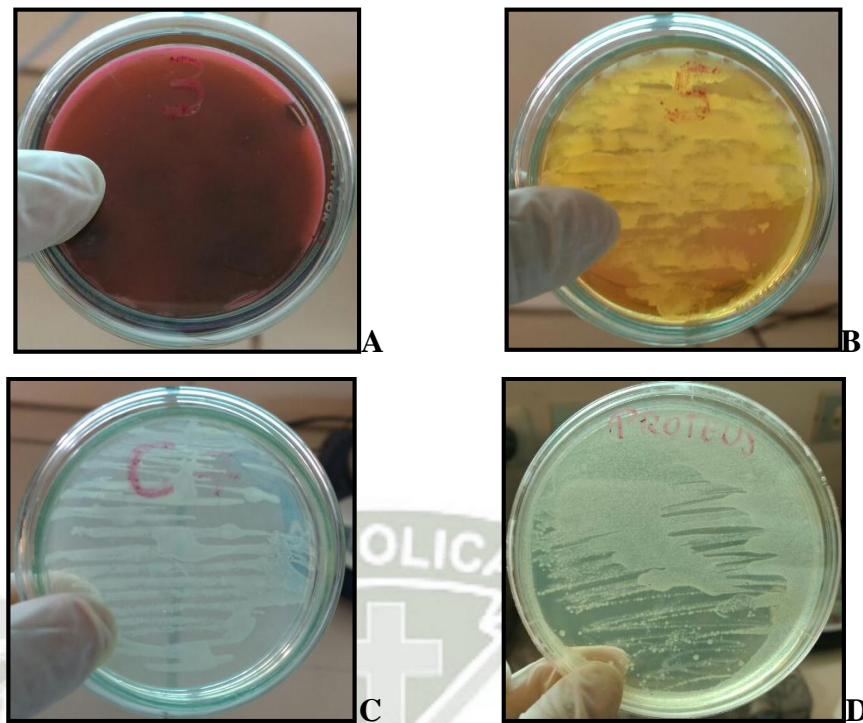


Figura 44. Cepas Seleccionadas.

4.6.1. Extracción de DNA

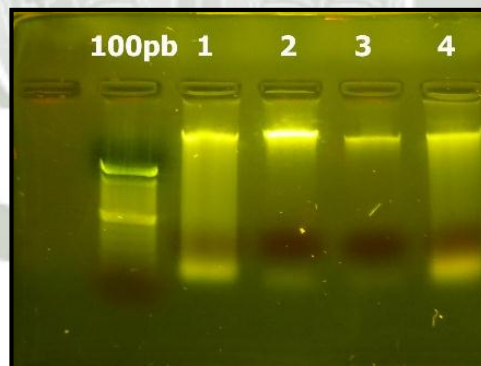


Figura 45. Amplificación del gen 16S rRNA en gel de agarosa 1%.

En la **Figura 45**, se observa el gel de agarosa de las 4 cepas seleccionadas; con el marcador molecular de DNA de 100 pb, esto indicó que sí hubo presencia de DNA de bacterias, de acuerdo con el Manual de técnicas básicas de Biología Molecular¹¹⁶.

4.6.2. Secuenciación RNAr 16S de cada cepa y Arbol Filogenético

Se hizo la secuenciación RNAr 16S de las 4 cepas (Anexo 06), las cuales fueron comparadas en la base de datos del NCBI, realizando un BLAST donde se obtuvo un E-value aproximado a cero, según Stephen F. mientras menor sea el valor indicará un alineamiento significativo biológicamente según Stephen F.¹¹⁷ y también se tomó en cuenta el porcentaje de identidad, este indica la identidad que posee la secuencia que se ha introducido con la secuencia de la base de datos¹¹⁸.

Tabla 39. BLAST - Cepa 9

Análisis BLAST		
Especie	E Value	Ident
<i>Uncultured bacterium clone denovo</i> 18878	0.10	93%
<i>Uncultured bacterium clone</i> ncd2530c12c1	0.10	93%
<i>Uncultured pusillisomas sp clone</i> DVASW J220	0.39	93%

De acuerdo a la **Tabla 42**, la secuencia analizada tiene similitud a un microorganismo de género y especie desconocida, por lo tanto, según este análisis es una **bacteria nueva**.

Tabla 40. BLAST - Cepa 3

Análisis BLAST		
Especie	E Value	Ident
<i>Enterobacter hormaechei strain</i> LAB 229	0.0	95%
<i>Enterobacter sp strain</i> CYN M1	0.0	95%
<i>Pseudomona sp strain</i> HBUM200069	0.0	95%

En la **Tabla 43**, la secuencia analizada indica la homología a un microorganismo del género *Enterobacter* y especie *hormaechei* con un porcentaje de 95% de identidad. Este resultado coincide con lo que se infirió en la **Tabla 38**, con respecto al género de este microorganismo.

Tabla 41. BLAST – Cepa 5

Análisis en BLAST		
Especie	E value	Ident
<i>Bacillus sonorensis strain</i> HQB810	0.0	99 %
<i>Bacillus sonorensis strain</i> Y38	0.0	98 %
<i>Bacillus sp. strain</i> XSJ001YB	0.0	98%

En la **Tabla 44**, la secuencia analizada indica la similitud a un microorganismo del género *Bacillus* y especie *sonorensis* con un porcentaje de 99% de identidad. Este resultado coincide con lo que se infirió en la **Tabla 38**, con respecto al género de este microorganismo.

Tabla 42. BLAST – Cepa 7

Análisis en BLAST		
Especie	E value	Ident
<i>Citrobacter youngae strain</i> ZF2	0.0	97 %
<i>Citrobacter ferundii strain</i> 18-1	0.0	97 %
<i>Citrobacter ferundii strain</i> B38	0.0	97 %

En la **Tabla 45**, la secuencia analizada indica la homología a un microorganismo del género *Citrobacter* y especie *youngae* con un porcentaje de 97% de identidad. Este resultado coincide con lo que se infirió en la **Tabla 38**, con respecto al género de este microorganismo.

Los resultados obtenidos en las **Tablas 42, 46, 47 y 45** mostraron un porcentaje entre 95 y 99% de identidad, lo cual, indicó que las secuencias analizadas no son idénticas a las secuencias presentadas, pero se observa que comparten cierto porcentaje de homología.

Se seleccionaron las secuencias con mayor identidad a la secuencia analizada y menor valor de E-value. Se alinearon las secuencias con el programa Clustal Omega, donde se construyeron los árboles filogenéticos.

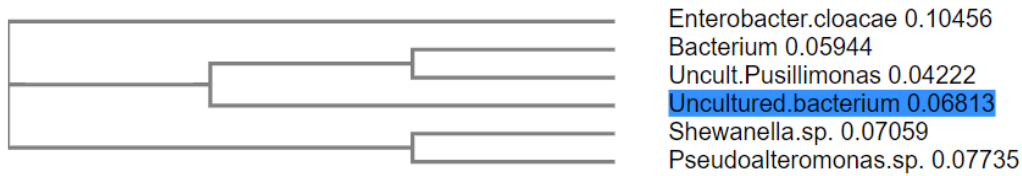


Figura 46. Árbol Filogenético - Uncultured bacterium

En la **Figura 46**, se observa el alineamiento y filogenia de la secuencia analizada con otras más próximas a esta, por lo tanto se dice que tiene cercanía a otras bacterias de género desconocido. También se observa que existen 3 géneros alejadas que se alinearon junto con la anterior, las cuales fueron *Enterobacter cloacae*, *Shewanella sp.* y *Pseudoalteromonas sp.* y que no tiene relación.



Figura 47. Árbol Filogenético - *Enterobacter hormaechei*

En la **Figura 47**, se observa el alineamiento y filogenia de la secuencia analizada con otras más próximas a esta, por lo tanto se dice que tiene cercanía al género *Klebsiella michiganensis*. También se observa que existen otros géneros alejadas que se alinearon junto con la anterior, las cuales fueron en su mayoría del género *Pseudomona sp.*, *Enterobacteriaceae* y que no tienen relación alguna.

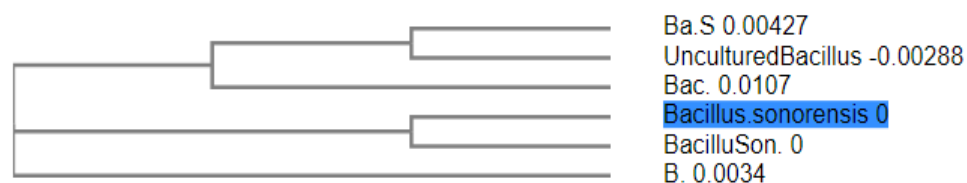


Figura 48. Árbol Filogenético - *Bacillus sonorensis*

En la **Figura 48**, se observa el alineamiento y filogenia de la secuencia analizada con otras más próximas a esta, por lo tanto se dice que tiene cercanía al género *Bacillus sp.* También se observa que existen otras especies de *Bacillus sp.* que se alinearon junto con la anterior, que no tienen relación.



Figura 49. Árbol Filogenético - *Citrobacter youngae*

En la **Figura 49**, se observa el alineamiento y filogenia de la secuencia analizada con otras más próximas a esta, por lo tanto se dice que tiene cercanía al género *Citrobacter youngae*. También se observa que existen otros géneros y especies alejadas que se alinearon junto con la anterior, las cuales fueron *Citrobacter sp.* y *Uncultured Enterobacteriaceae* y que no tienen relación alguna.

4.7. Diseño y construcción de biopilas con “tierra” y “abonos orgánicos”

- ✓ **Construcción de Biopilas con tierra**

Tabla 43. Biorremediación con Biopilas - Tierra

Biopila	Concentración de Petróleo crudo (mg/Kg)	(UFC/Kg)*
B. Testigo	25654	3.38 x 10 ⁵
B. Experimental 1	28084	9.73 x 10 ⁸

***UFC/Kg:** Concentración de microorganismos por kilogramo de tierra a tratar.

La biopila **Exp 1**, inició con **28084 mg/Kg** de concentración de petróleo crudo (similar a la concentración de la biopila **Testigo**) mezclado con 10 kilos de tierra y se le agregó **9.73 x 10⁸ UFC/Kg** del consorcio bacteriano, dando inicio a la biorremediación, utilizando de guía el trabajo Biodegradación de crudo de petróleo de Escalante Guzmán, Rocío Miluska.

✓ **Construcción de Biopilas con abonos orgánicos**

• **Compost**

Tabla 44. Biorremediación con Biopilas – Compost.

Biopila	Concentración de Petróleo crudo (mg/Kg)	(UFC/Kg)*
B. Testigo	25654	3.38 x 10 ⁵
B. Experimental 2	25633	8.93 x 10 ⁸

***UFC/kg:** Concentración de microorganismos por kilogramo de tierra a tratar.

• **Humus**

Tabla 45. Biorremediación con Biopilas – Humus.

Biopila	Concentración de Petróleo crudo (mg/Kg)	(UFC/Kg)*
B. Testigo	25654	3.38 x 10 ⁵
B. Experimental 3	27127	8.31 x 10 ⁸

***UFC/kg:** Concentración de microorganismos por kilogramo de tierra a tratar

En las **tablas 47 y 48**, se observa las concentraciones iniciales **25633 mg/Kg** y **27127 mg/Kg** de petróleo crudo, mezclados con 10 kg de compost y 10 kg de humus, se le

agregó 8.93×10^8 UFC/Kg y 8.31×10^8 UFC/Kg del consorcio bacteriano a las biopilas **Exp 2** y **Exp 3**, respectivamente, dando inicio a la biorremediación, utilizando de guía el trabajo Biodegradación de crudo de petróleo de Escalante Guzmán, Rocío Miluska.



Figura 50. Sistema de Biopilas

4.8. Parámetros controlados en los Sistemas de Biopilas

✓ pH

Para la biodegradación el rango de pH óptimo está entre 6 – 8, según la investigación de Ercoli E, Gálvez J, Di Paola M. y si se desea para un período largo de tiempo Leahy JG, 1990; Dibble JT, 1979 recomienda que el pH sea neutro, entre 7.4 – 7.8.

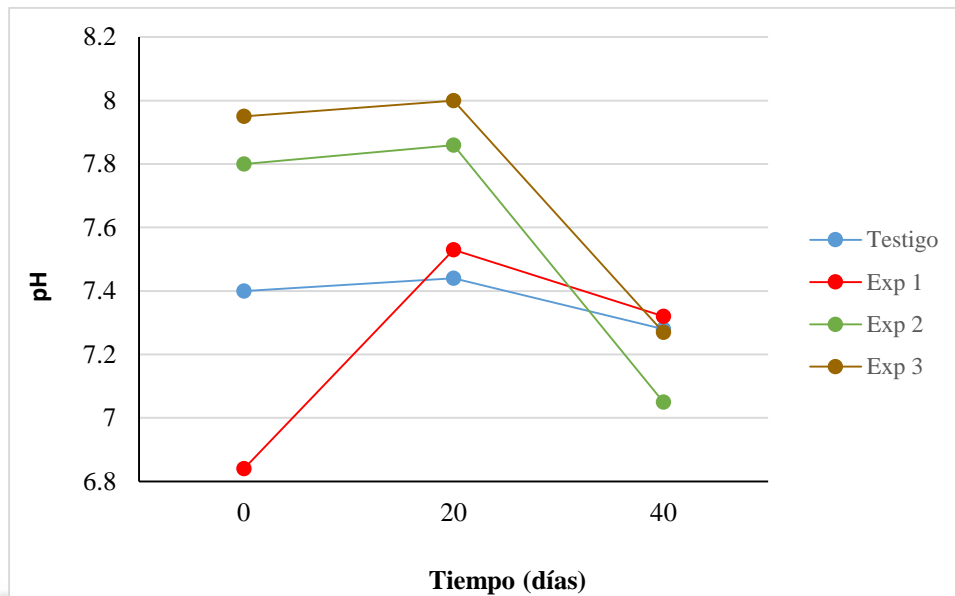


Figura 51. Comparación de pH con respecto al tiempo en las Biopilas.

El pH en las biopilas se mantuvo entre neutralidad y basicidad, a los 20 días las biopilas **Exp 1, Exp 2 y Exp 3** tuvieron un incremento mínimo, esto debido al proceso de remediación llevado a cabo por la intensa actividad del consorcio de microorganismos, y a los 40 días se observa una ligera disminución del pH en las biopilas, las cuales terminaron con un pH neutro de 7.05 a 7.64, que fue óptimo para todo este proceso. (Anexo 07).

✓ **Humedad**

El agua tiene una gran importancia en el suelo para llevar a cabo el proceso de biorremediación, regulando la actividad microbiana.

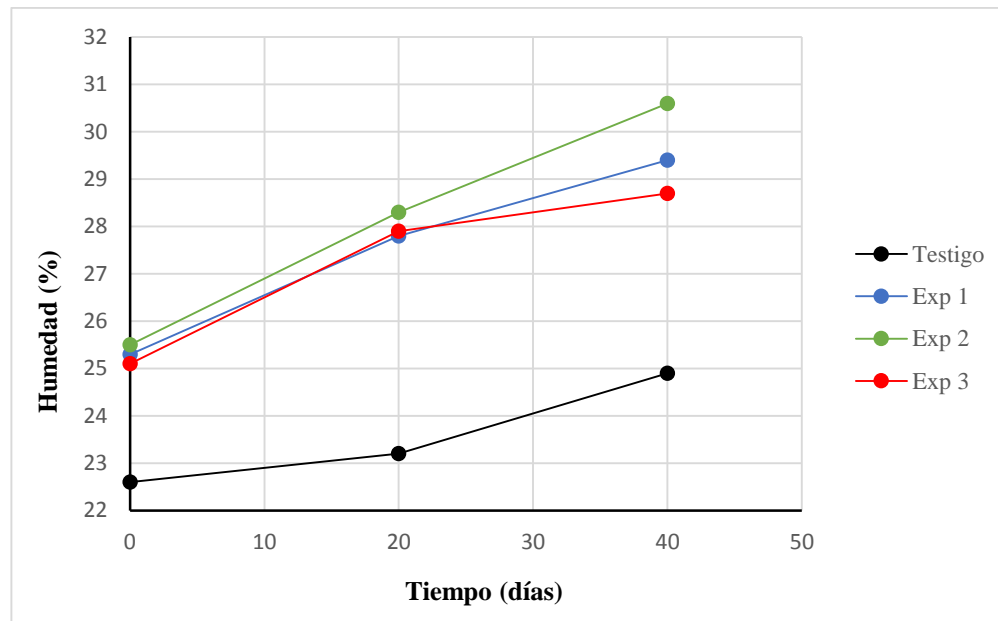


Figura 52. Comparación del % de Humedad con respecto al tiempo

La **Figura 52** muestra que para la biopila **Testigo**; no se necesitó un buen porcentaje de humedad, debido a que su función fue solo el de controlar; mientras que en las biopilas **Exp 1**, **Exp 2** y **Exp 3**; fue de gran importancia controlar la humedad y mantenerlo en el rango óptimo de 20 a 60% para la buena actividad microbiana, para el transporte de nutrientes, para que lleve a acabo procesos metabólicos y por lo tanto una buena biorremediación. (Anexo 08).

Van Deuren et col. 1997, indica que una alta concentración de humedad puede impedir el movimiento de aire a través del suelo, además puede aumentar los costos, durante el proceso de biorremediación¹¹⁹. Para mantener la humedad óptima se agregó el caldo nutritivo con el consorcio y/o agua destilada, dependiendo del porcentaje de humedad que dio la toma de muestras anteriores.

✓ **Temperatura**

La temperatura entre 20 y 30°C permite el crecimiento de bacterias, a temperaturas superiores de 40°C e inferiores a 0°C se inhibe el crecimiento microbiano en el trabajo

de investigación de Torres y Zuluaga, 2009. La temperatura del suelo afecta considerablemente la actividad microbiana y las tasas de biodegradación.

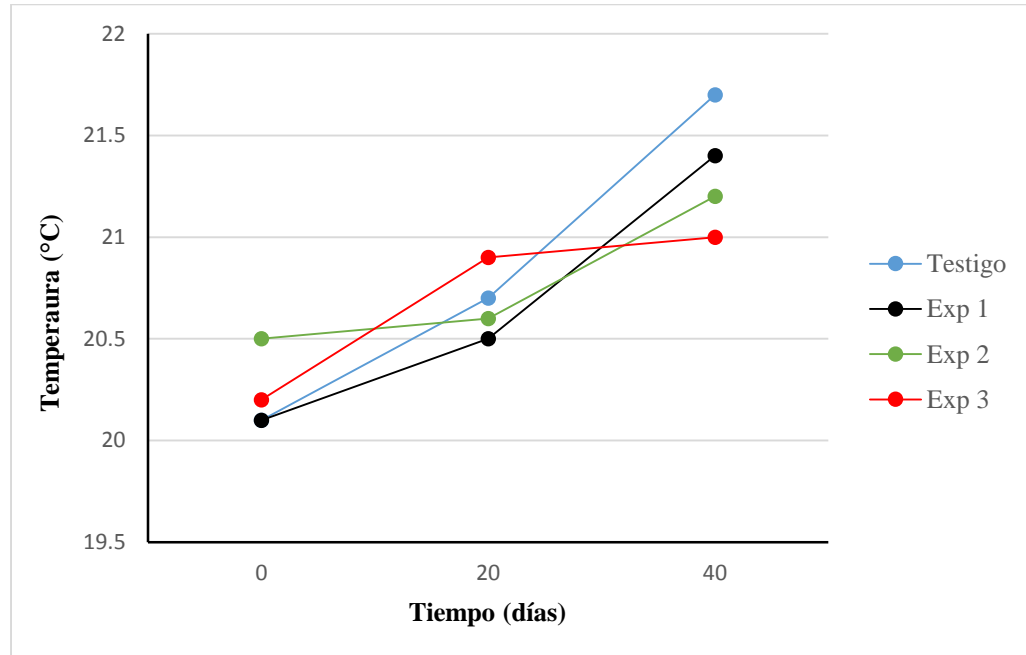


Figura 53. Comparación de Temperatura (°C) con respecto al tiempo

La temperatura de las biopilas **Exp 1**, **Exp 2** y **Exp 3**, se mantuvieron en el rango requerido de 20 – 30°C, para que el consorcio bacteriano tenga una actividad de biorremediación adecuada, así como un buen desarrollo y crecimiento del consorcio bacteriano. (Anexo 09).

✓ **Conteo de Microorganismos**

La concentración del consorcio bacteriano fue importante para llevar a cabo la biorremediación del suelo, según Leahy y Colwell en 1990 indicaron que existen microorganismos degradadores de hidrocarburos como *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomona sp*, *Acinetobacter*, etc.

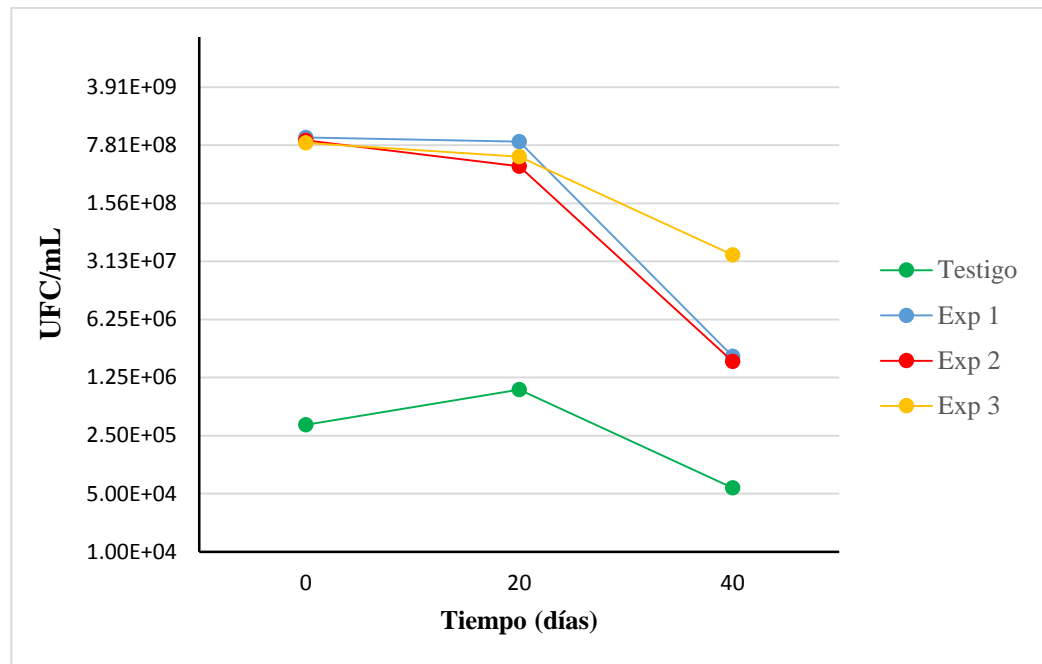


Figura 54. Comparación de Concentración del consorcio microbiano con respecto al tiempo

En la **Figura 54**, la concentración del consorcio bacteriano de la biopila “testigo” inició con una concentración de 3.38×10^5 UFC/mL (100%), al cabo de 20 días ésta concentración subió a 8.93×10^5 UFC/mL, y a los 40 días terminó con una concentración final de 5.88×10^4 UFC/mL (17,3%).

La biopila Exp 1, inició con una concentración de 9.73×10^8 UFC/mL (100%), al cabo de 20 días ésta concentración bajó a 8.62×10^8 UFC/mL, y a los 40 días terminó con una concentración final de 2.25×10^6 UFC/mL (0.23%).

La biopila Exp 2, inició con una concentración de 8.93×10^8 UFC/mL (100%), al cabo de 20 días ésta concentración bajó a 4.35×10^8 UFC/mL, y a los 40 días terminó con una concentración final de 1.96×10^6 UFC/mL (0.22%).

La biopila Exp 3, inició con una concentración de 8.31×10^8 UFC/mL (100%), al cabo de 20 días ésta concentración bajó a 5.68×10^8 UFC/mL, y a los 40 días terminó con una concentración final de 3.74×10^7 UFC/mL (4.5%). (Anexo 10)

Esto indicó que el proceso de biorremediación se estuvo llevando a cabo tal y como también lo describe Escalante Guzmán, Rocio Miluska en su trabajo de investigación, en donde el porcentaje de la concentración final de microorganismos fue de 0.14% a los 30 días, y que tuvo un resultado bueno en la remediación de suelos.

✓ **Concentración de HTP's**

Según Cárdenas, 2006 el uso de cultivos mixtos o consorcio bacteriano favorece una degradación mayor con el uso de bioestimulación y teniendo en cuenta el tiempo empleado para llevar a cabo el proceso y así poder obtener porcentajes mayores de remoción de HTP's similares a los logrados en otros trabajos. (Anexo 11).

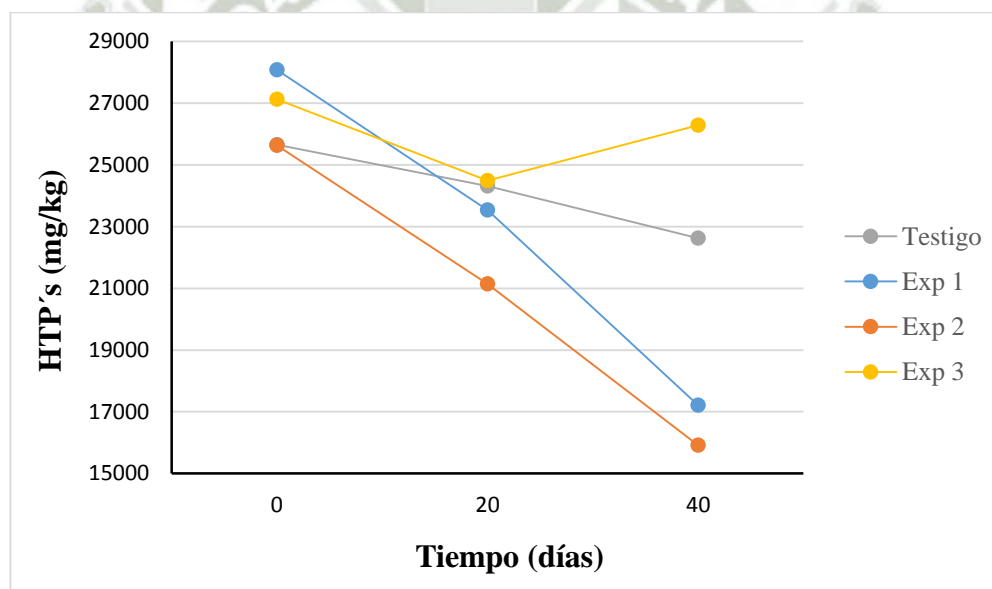


Figura 55. Comparación de la Concentración de HTP's con respecto al tiempo

En la **Figura 55**, en la biopila “testigo” se observa que no hubo un buen porcentaje de remoción (11.8%) a los 40 días, debido a que sólo se llevó a cabo con las bacterias nativas y con la influencia de las condiciones ambientales normales tal y como lo menciona Belloso y col, quien encontró menor reducción de hidrocarburos con bacterias nativas (12%) a los 30 días y Sabirova en el 2000 logro solo un 8%.

En las biopilas **Exp 1 y Exp 2** hubo un porcentaje de remoción similar (38.7% y 37.9%), a los 40 días, respectivamente; esto debido a que se inóculo el día 20 con el consorcio nativo seleccionado y se estuvo controlando los parámetros, según Belloso y col, lograron una degradación del 45%, debido a que, sólo inocularon una sola cepa bacteriana oleofílica y Diaz y col en 1999 evaluaron la biodegradación de hidrocarburos utilizando un consorcio microbiano de la rizosfera de *Cyperus Laxu Lam*, obteniendo un 62.68% de remoción a los 34 días.

En la biopila **Exp 3**, a los 20 días hubo un 9.7% de remoción de HTP's y se esperaba que a los 40 días siga con la remoción de hidrocarburos, pero se observó que la concentración de HTP's subió un 6.6%, por lo que sólo hubo un 3.1% de biorremediación al final del proceso. Según Martínez-Borges, José y col. 2014, en su estudio del uso de humus de lombriz para la biorremediación de suelos, esto se debe a que hubo cambios en las características químicas de las mezclas suelo-desecho, también Alexander en 1991 indicó que el humus ha sufrido varias degradaciones y transformaciones y que está conformada por sustancias polimerizadas como: compuestos aromáticos, polímeros de ácido urónico y compuestos que contienen fósforo.

4.9.Comparación Estadística de parámetros (HTP's y Conteo Bacteriano)

✓ Remoción de HTP's:

En la **Tabla 49**, muestra la prueba de Levene que da un valor estadístico de **1.624** con una probabilidad asociada de **0.116** el cual es mayor de 0.05 (nuestro nivel de significación) por lo tanto se asumió que las varianzas de los 4 tratamientos de la investigación son iguales y por lo tanto se justificó el uso del ANOVA.

Tabla 46. Análisis de la variable HTP's

Prueba de homogeneidad de varianzas			
HTP's			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1.624	3	56	.116

En la **Tabla 50**, se muestra el análisis de varianza para la variable **HTP's**, el cual dió un estadístico F de **6.646** con una probabilidad asociada de **0.001** el cual es menor de 0.05 (nuestro nivel de significación) por lo tanto se rechazó la hipótesis nula que asume igualdad de medias y se asumió que las medias son distintas.

Tabla 47. Análisis de ANOVA para HTP's

ANOVA					
HTP's					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	204889995	3	68296665	6.646	.001
Dentro de grupos	575458213	56	10276039		
Total	780348208	59			

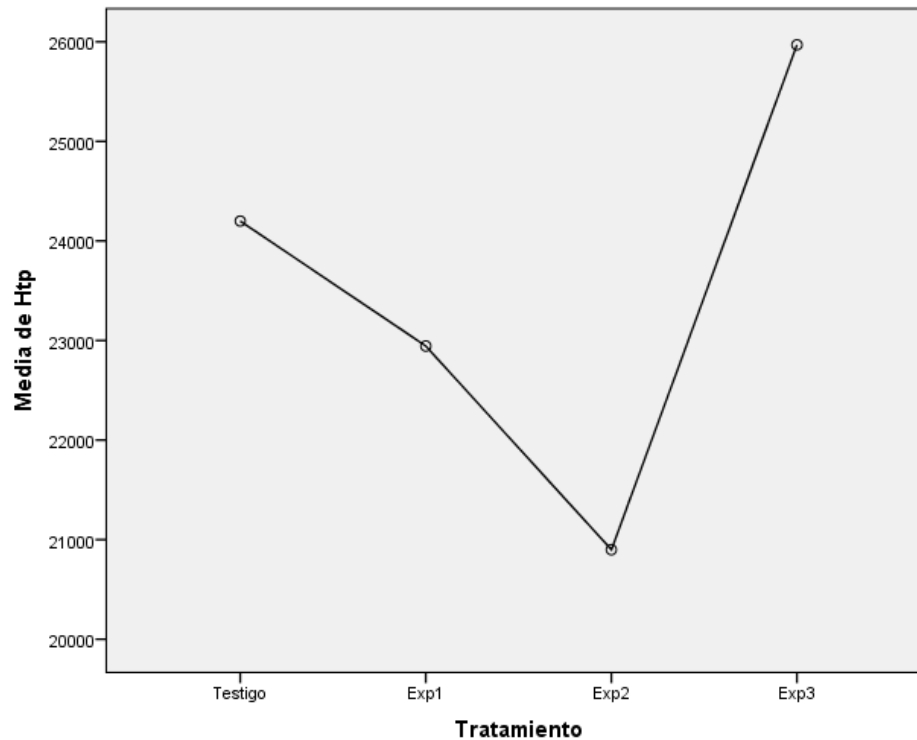


Figura 56. Comparación de medias para HTP´s

En la **Figura 56**, se observa las medias de HTP´s después de 40 días para cada biopila, la Exp 2 es la que tiene menor concentración de HTP´s y la Exp 3 es la que tiene mayor concentración de HTP´s, estos supuestos serán aclarados con el ANOVA. Ya que se observó que las medias son diferentes, se procedió a realizar la prueba de Tukey para saber dónde es que se encuentran estas diferencias:

Tabla 48. Análisis de Tukey para HTP´s

HTP´s			
HSD Tukey			
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Exp2	3	20899.33	
Exp1	3	22944.33	
Testigo	3		24199.67
Exp3	3		25969.33

En la **Tabla 51**, se observa la prueba de Tukey, la cual indicó que existen dos grupos bien diferenciados. El primer grupo, es el que tiene menor concentración de HTP's y está conformado por los tratamientos Exp2 y Exp1, esto indicó que en el Exp 2 hubo menor biodegradación de HTP's que en el Exp 1, pero que es una diferencia insignificante ya que en ambas biopilas hubo un buen porcentaje de biodegradación. Y en el segundo grupo son los que tienen mayor concentración de HTP's y está conformado por los tratamientos Testigo y Exp3, esto indicó que no hubo gran porcentaje de biodegradación de HTP's en la Exp 3.

✓ **Conteo Bacteriano:**

En la **Tabla 52**, se muestra la prueba de Levene que da un valor estadístico de **1.947** con una probabilidad asociada de **0.157** el cual es mayor de 0.05 (nuestro nivel de significación) por lo tanto se asumió que las varianzas de los 4 tratamientos de la investigación son iguales y por lo tanto se justificó el uso del ANOVA.

Tabla 49. Análisis de la variable Conteo Bacteriano

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Conteo Bacteriano			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1.947	3	56	.157

En la **Tabla 53**, muestra el análisis de varianza para la variable **CONTEO BACTERIANO**, el cual dió un estadístico F de **9.205** con una probabilidad asociada de **0.000** el cual es menor de 0.05 (nuestro nivel de significación) por lo tanto se rechazó la hipótesis nula que asume igualdad de medias y se asumió que las medias son distintas.

Tabla 50. Análisis de ANOVA para el Conteo Bacteriano

ANOVA					
Conteo Bacteriano					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3.18E+22	3	1.06E+22	9.205	.000
Dentro de grupos	6.44E+22	56	1.15E+21		
Total	9.62E+22	59			

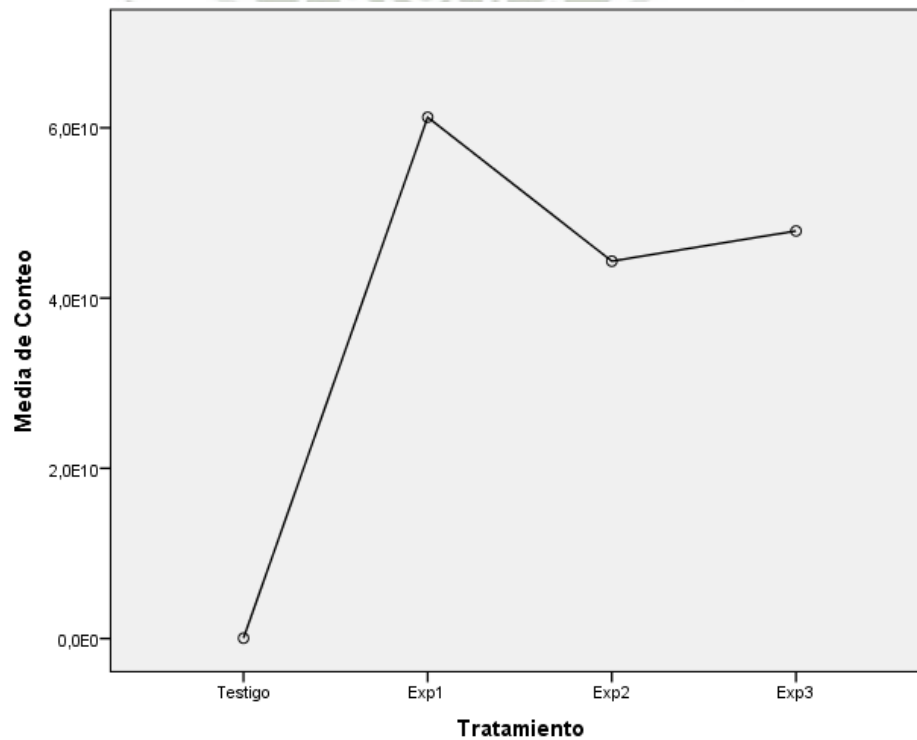


Figura 57. Comparación de medias para Conteo Bacteriano

En la **Figura 57**, se observa las medias del CONTEO BACTERIANO después de 40 días para cada biopila, el Testigo es el que contiene menor cantidad de microorganismos y la Exp 1 es la que tiene mayor cantidad de microorganismos, estos supuestos serán aclarados con el ANOVA.

Ya que se observó que las medias son diferentes, se procedió a realizar la prueba de Tukey para saber dónde se encuentran estas diferencias:

Tabla 51. Análisis de Tukey para HTP's

Conteo Bacteriano			
HSD Tukey			
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Testigo	3	4.2993E+07	
Exp2	3		4.4332E+10
Exp3	3		4.7880E+10
Exp1	3		6.1242E+10

En la **Tabla 54**, se observa la prueba de Tukey, esta tabla indica que existen dos grupos bien diferenciados. El primer grupo es el que tiene menor CONTEO BACTERIANO y está conformado solo por el tratamiento Testigo, ya que a esta biopila durante el tratamiento no se inoculó con consorcio bacteriano y sólo trabajo con sus microorganismos nativos.

Mientras que en el segundo grupo se encuentran los que tienen mayor CONTEO BACTERIANO y está conformado por los tratamientos: Exp2, Exp3 y Exp1, esto debido a que durante el tratamiento se les inoculó con consorcio bacteriano seleccionado para llevar a cabo la biodegradación con los distintos sustratos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. Según la evaluación fisicoquímica del suelo, resultó ser apta para el tratamiento con biopilas tanto con el sustrato tierra como con los abonos orgánicos; la concentración de HTP's inicial fue de **25654 mg/Kg**, la cual supera el estándar de calidad ambiental del suelo (ECA – DS N° 002-2013-MINAM).
2. Se logró aislar, caracterizar e identificar 9 cepas microbianas de las muestras de suelo de las zonas superficie, medio e inferior, mediante Tinción Gram y pruebas bioquímicas.
3. De las 9 cepas microbianas nativas, 4 cepas dieron una Actividad Emulsificante y una Capacidad Degradativa mayor a las otras 5 cepas nativas, por lo tanto son las que se utilizaron en mayor concentración y se adaptaron al sistema de biopilas (**Exp 1, Exp 2 y Exp 3**) y fueron capaces de utilizar los HTP's como fuente de carbono y energía.
4. Se diseñó y construyó los sistemas de biopilas con los sustratos “tierra y abonos orgánicos” para la biorremediación de suelos contaminados con HTP's.
5. Se determinó la concentración de microorganismos cada 20 días, en la primera biopila empezó con una concentración inicial a 0 días de 3.38×10^5 UFC/mL (100%) y una final a 40 días de 5.88×10^4 UFC/mL (17.3%); en la segunda biopila (**Exp 1**), con sustrato “tierra”, empezó con una concentración inicial de 9.73×10^8 UFC/mL (100%) y a los 40 días se obtuvo una concentración final de 2.25×10^6 UFC/mL (0.23%); mientras que en las biopilas (**Exp 2 y Exp 3**), se hizo con los sustratos “compost” y “humus”, que empezaron con una concentración inicial de 8.93×10^8 UFC/mL (100%) y de 8.31×10^8 UFC/mL (100%), respectivamente; y

a los 40 días se obtuvo una concentración final de 1.96×10^6 UFC/mL (0.22%) y 3.74×10^7 UFC/mL (4.5%), respectivamente.

6. En esta investigación se logró la remoción de HTP's con el sustrato Tierra en un porcentaje de 16.2% en 20 días y de 38.7% en 40 días; con el sustrato Compost en un porcentaje de 17.5% en 20 días y 37.9% en 40 días; mientras que con el sustrato Humus un porcentaje de 9.7% en 20 días y 3.1% en 40 días con la aplicación del consorcio bacteriano obtenido. Se pudo reducir los HTP's utilizando los microorganismos nativos en un medio adecuado con los nutrientes necesarios para su actividad microbiana; también se monitoreo los parámetros (pH, temperatura, humedad, conteo microbiano y concentración de HTP's) los cuales indicaron un proceso de biorremediación óptimo.
7. Estadísticamente se concluye que entre las biopilas Exp 1 y Exp 2, no hubo diferencias significativas, ya que ambos tuvieron un porcentaje similar de biorremediación de suelo; mientras que en la biopila Exp 3, si hubo diferencia significativa con respecto a las biopilas Exp 1 y Exp 2; ya que esta no tuvo un buen porcentaje de biorremediación.

RECOMEDACIONES

1. Se recomienda el estudio y uso de otros sustratos y/o mezcla de sustratos como cortezas de árboles, estiércol de animales, materiales ligno-celulósicos, etc, para llevar a cabo la biorremediación de suelos contaminados.
2. Utilizar otras metodologías de remediación como Landfarming, Microrremediación, Bioventeo, etc, empleando los sustratos usados en el presente proyecto (humus y compost).
3. Identificar los microorganismos nativos presentes en los sustratos para cualquier método de remediación.
4. El lixiviado que se recolecta de las biopilas durante todo la etapa de biorremediación puede ser analizado para ver cuánto ha sido la variación en los niveles de metales pesados, materia orgánica, concentración de HTP's, etc.
5. Realizar análisis fisicoquímicos al sustrato "humus" para saber cómo influye éstas características en la biorremediación.
6. Se recomienda realizar los procesos de biorremediación durante un período de tiempo un poco más prolongado para obtener mayores porcentajes de remoción de HTP's.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. PetroEarth; 2010. Algunas Generalidades Del Petróleo. Disponible en: <http://www.petroearth.com/>
2. Administración Nacional de Combustibles, Alcohol y Portland; 1931 (ANCAP). El Mundo del Petróleo. Disponible en: <https://www.ancap.com.uy/>
3. Dirección General de Industrias, Energía y Minas; 2002.
4. IES. “Cristóbal de Monroy, Dpto. de Tecnología”.
5. Geo. Méndez O. PDVSA. ¿Qué es el Petróleo?.
6. Howe – Grant, Clark y Brown. Composición del petróleo crudo. 1996.
7. Sugiura et al. Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium; 1997.
8. Speight. The chemistry and technology of petroleum; 1991.
9. Watkinson y Morgan. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms; 1990.
10. Blumer. Polycyclic Aromatic Compounds in Nature; 1976.
11. Darío Sbarato R, Sbarato V y Ortega Jose E. Predicción y evaluación de impactos ambientales sobre la atmosfera; 2007.
12. Ortiz-Salinas R. Polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs) in soils of the low alluvial plain in the state of Tabasco. Mexico; 2011.
13. Malawska M, Bojakowska I y Wilkomirski B. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in peat and plants from selected peat-bogs in the north-east. Poland; 2002.
14. Mohina G y Moreno P. Química organica; Libro de Texto Química II; Biblioteca digital – Ciencias. Volumen 1; 2011.
15. Blanco Díez J I. Máster Petróleo y Gas; 2015.
16. Dalzell H W y Bardgett. Phosphorus In Action: Biological Processes In Soil Phosphorus Cycling; 1991, 2005.
17. Alexander, M. Biodegradation and Bioremediation. 2nd Edición. Academic. San Diego, United States; 1991.
18. Servicios Agropecuarios de la Costa S.A. de C.V; 2015.

19. Van Straalen. Assessment of soil contamination – a functional perspective; 2002.
20. Eweis, J B, Ergas, S J, Chang, D.P.V. y Schroeder, E.D. Principios de biorrecuperación. McGrawHill, Madrid; 1999.
21. Levin, M A. y Gealt M A. Visión general del biotratamiento y su futuro En: Levin M. A., Gealt M. A. Editors. Biotratamiento de Residuos Tóxicos y Peligrosos. McGraw Hill / Interamericana, Madrid, España; 1997. p. 1 – 19.
22. Elías-Murguía R L y Martínez V. Suelos contaminados con hidrocarburos. In Ruiz, F. J. F. (ed.). Causas y Consecuencias de la Contaminación del Suelo. Mesa Redonda, Departamento de Suelos. UACH, Chapingo, México; 1991. p. 46-53.
23. Semple K T, Morriss A W J y Paton G I. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. European Journal of Soil Science 54; 2003. p. 809-818.
24. Bossert I y Bartha, R. The Fat of Petroleum in Soil Ecosystems. In: Atlas, R.M., Ed., Petroleum Microbiology, Macmillan, New York; 1984. p. 440-445.
25. Ulrich DA. Test of Gross Motor Development. 2nd ed. Austin, TX: Pro-Ed; 2000.
26. Mackay N y Betts W B. The fate of chemicals in soil. in: Biodegradation: natural and synthetic materials, W.B. Betts (Ed.), Springer Verlag. London; 1991. p. 89-117.
27. Centro de Derechos Económicos y Sociales (CDES); 1994.
28. British Medical Journal; 1993. p. 307: 1251-1255.
29. Journal of Forensic Science; 1991. p. 36 (4): 1240-1245.
30. IARC Scientific Publications; 1988. p. 85: 3-18.
31. American Journal of Industrial Medicine; 1997. p. 31: 287-295.
32. Olivas E. Manual de prácticas de Microbiología básica; 2004.
33. Pérez Silva, R M, Camacho Pozo M I, Gómez Montes de Oca J M, Ábalos Rodríguez A, Viñas M. y Cantero Moreno D. Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. Revista cenic Ciencias Biológicas; 2007. p. 39(1), 44- 51.
34. Daubaras D and Chakrabarty A M. The environment, microbes and bioremediation: microbial activities modulated by the environment; 1992.

35. Head I y R. Swannell. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Curr Opin Biotechnol*; 1999. p. 10: 234-239.
36. Atlas R. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. *Chem Technol Biotechnol*; 1991. p. 52: 149-156.
37. Swalnnel R, Lee K y McDonagh M. Field Evaluation of Marine Oil Spill Bioremediation. *Microbiol Review*; 1996. p. 60: 342-365.
38. Schlegel HG. *General microbiology*. 7 ed. Cambridge University Press; 1993. p. 234-244, 446-464.
39. Toledo K. *Escuela Superior Politécnica del Litoral*; 2009.
40. United States Environmental Protection Agency; 1983.
41. Meckenstock R U y Mouttaki H. Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons; 2011.
42. Widdel F, et Rabus, R. Anaerobic degradation of Saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*; 2001. p. 12(3), 259-276.
43. Hofrichter M y Fritsch A. Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems II. The ligninolytic enzymes of the coal-humic-acid-depolymerizing fungus *Nematoloma frowardii* b19. *Appl Microbiol Biotechnol*; 1997. p. 47(4):419-424.
44. Van Beilen J B, Li Z, Duetz W A, Smits T H M y Without B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil Gas Sci. Technol*; 2003. p. 58 427–440.
45. Wentzel A, Ellingsen T E, Kotlar H K, Zotchev S B y Throne-Holst M. Bacterial metabolism of long chain n-alkanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol*; 2007. p. 76 1209–1221.
46. Harayama S, Kasai Y y Hara A. Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr. Opin. Biotechnol*; 2004. p. 15 205–214.
47. Head I M, Jones D M y Roling W F. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat. Rev. Microbiol*; 2006. p. 4 173–182.
48. Yakimov M M, Timmis K N y Golyshin P N. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol*; 2007. p. 18 257–266.

49. Rehm H J, et Reiff I. Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. Springer Berlin Heidelberg; 1981. p. 175-215.
50. Cerniglia C E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Current Opinion in Biotechnology; 1993. p. 4(3), 331-338.
51. Kanally R A, et Harayama S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. Journal of Bacteriology; 2000. p. 182(8), 2059-2067.
52. Heitkamp M A, Franklin W, et Cerniglia C E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. Applied and Environmental Microbiology; 1988a. p. 54(10), 2549-2555.
53. Heitkamp M A, Freeman J P, Miller D W, et Cerniglia C E. Pyrene degradation by a Mycobacterium sp.: identification of ring oxidation and ring fission products. Applied and Environmental Microbiology; 1998b. p. 54(10), 2556-2565.
54. Kelley I, Freeman J P, et Cerniglia C E. Identification of metabolites from degradation of naphthalene by a Mycobacterium sp. Biodegradation; 1990. p. 1(4), 283-290.
55. Neher T M, et Lueking D R. Pseudomonas fluorescens ompW: Plasmid localization and requirement for naphthalene uptake. Canadian journal of microbiology; 2009. p. 55(5), 553-563.
56. Pérez-Pantoja D, González B y Pieper DH. Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. In Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Timmis, K.N. (ed). Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010^a. p. 799-837.
57. Mallick S, Chakraborty J y Dutta T K. Role of oxygenases in guiding diverse metabolic pathways in the bacterial degradation of low-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. Critical Reviews in Microbiology; 2011. p. 37(1):64-90.
58. Riser-Roberts E. Remediation of Petroleum Contaminated Soils: Biological, Physical, and Chemical Processes. CRC Press, Boca Raton; 1998.

59. Glazer A N y Nikaido H. Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology. W.H. Freeman and Company, New York; 1995.
60. Atlas R M , Unterman R. Bioremediation. In: Demain AL & Davies JE (Eds) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Washington D.C.; 1999. p. 666-681
61. Alexander M. Biodegradation and Bioremediation. London; 1999.
62. Eweis J B, Ergas S J, Chang P V y Schroeder E D. Principios de biorrecuperación: tratamiento para la descontaminación y regeneración de suelos; 1999.
63. United States Environmental Protection Agency; 1998.
64. United States Environmental Protection Agency; 2000.
65. Remediación de Ecosistemas; 2006.
66. Exner J H, Flathman E, Jerger E. Bioremediation: Field Experience. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA; 1994.
67. Walter M V. Bioaugmentation. In: Hurst, CJ Manual of Environmental Microbiology. ASM Press, Washington, D.C; 1997. p. 753-765.
68. Cerniglia C E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation; 1992.
69. Chaîneau C H, Morel J L y Oudot J. Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings. Environmental Science and Technology; 1995. p. 1615-1621.
70. Short F T, Coles R G y Pergent-Martini C. Global seagrass distribution. In: Short, F.T., Coles, R.G. (Eds.), Global Seagrass Research Methods. Elsevier Science B.V, Amsterdam; 2005. p. 5-30.
71. Johansson K C, Metzendorf C y Soderhall K. Microarray analysis of immune challenged Drosophila hemocytes; 2005. p. 145-155.
72. Salleh A B, Ghazali N y Rahman, & Basri M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution. Indian Journal of Biotechnology; 2003.p. 411-425.
73. Van Deuren J, Wang Z. y Ledbetter J. Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. 3ª Ed. Technology Innovation Office, EPA; 1997. Disponible en: <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.

74. Riser-Roberts E. Remediation of petroleum contaminated soils. Lewis Publishers; 1998. p.542.
75. Pedro J, Alvarez J and Walter A. Bioremediation Technologies.2005.
76. Vogel T M, Walter M V. Bioaugmentation. In Manual of Environmental Microbiology; 2002.
77. Duba A G, Jackson K J, Jovanovich M C, Knapp R B et Taylor. TCE remediation using in situ, resting-state bioaugmentation. Environmental science et technology; 1996. p.1982-1989.
78. Ulrich A C, Edwards E A. Physiological and molecular characterization of anaerobic benzene-degrading mixed cultures. Environmental Microbiology; 2003.
79. Ulrich A C, Beller H R y Edwards E A. Metabolites detected during biodegradation of C-13(6)-benzene in nitrate-reducing and methanogenic enrichment cultures. Environmental Science and Technology; 2005. p. 6681-6691.
80. Volke S. Tecnologías de remediación de suelos contaminados.2002.
81. Crowley E, Alvey S y Gilbert E. Rhizosphere ecology of xenobiotic-degrading microorganisms. En Phytoremediation of soil and water contamination; 1997. p. 306.
82. Sellers K. Fundamentals of hazardous waste site remediation. Lewis Publishers; 1999. p.326.
83. Rubinos D A, Villasuso R, Muniategui S, Barral M T y Díaz-Fierros F. Using the landfarming technique to remediate soils contaminated with hexachlorocyclohexane isomers, Water, Air and Soil Pollution; 2007. p. 385-399.
84. Sora V. Descontaminación de suelos mediante la técnica de biorremediación “Landfarming”; 2016.
85. Sanscartier D, Reimer K, Zeeb B y Koch I. The effect of temperature and aeration rate on bioremediation of diesel-contaminated soil in solid-phase Bench-scale bioreactors. Soil and Sediment Contamination. 20(4); 2011.p. 353-369.
86. Colla T S, Andreatza R, Bucker F, Souza M M, Tramontini L, Prado G R, Frazzon A P, de Oliveira Camargo, Flávio Anastácio and Bento F M. Bioremediation assessment of diesel-biodiesel-contaminated soil using an alternative

- bioaugmentation strategy. *Environmental Science and Pollution Research*; 2013.p. 1-11.
87. Reddy C A. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Opinion Biotech*; 1995.p.320-328.
88. Jorgensen K S, Puustinen J, et Suortti A M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental pollution*; 2010.p.245-254.
89. Kodres C A. Coupled water and air flows through a bioremediation soil pile. *Environmental modelling et software*; 1998.p. 37-47.
90. Filauro G, Andreotti G, Arlotti D, et Reisinger H J. Blow out of Trecate 24 crude oil well: How bioremediation techniques are solving a major environmental emergency in a valuable agricultural area. *Contaminated Soil*; 1998. p.403-412.
91. Koning M, Hupe K, Luth J, Cohrs I, Quandt, et Stegmann R. Comparative investigations into the biological degradation of contaminants in fixed-bed and slurry reactors. *Contaminated soil*; 1998. p.531-538.
92. Porta A, Trovato A, McCarthy K, Uhler A et Andreotti G. Degradation of saturated and polycyclic aromatic hydrocarbons and formation of their metabolites in bioremediation crude oil-containing soils. In B. C. Vo. 1. Alleman, et A. Lesson (Eds.), *Proceeding of the International Symposium on In Situ and On- Site Bioremediation*, New Orleans, LO, USA; 1999.p. 505-510.
93. Weisman W. Analysis of petroleum hydrocarbons in environment media. Vol. 1. Total petroleum hydrocarbon criteria working group series. Association of American Railroads BP Oil Company. Armstrong Laboratory, Occupational Medicine Division. United States;1998.
94. ASTM D5369-93. Standard practice for extraction of solid waste samples for chemical analysis using soxhlet extraction. *Environmental Assessment, Book of Standards*; 2003.
95. US EPA 3540C. Soxhlet extraction organics. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. (Revision 3); 2006.

96. US EPA 3541. Automated soxhlet extraction. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. (Revision 0); 1994.
97. Schwab A P, Su J, Wetzell S, Pekarek S y Banks M K. Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. Environ Sci Technol. 33 (11); 1999.p.1940-1945.
98. Arce O, Rodríguez V R, Rojas A N. Identification of recalcitrant hydrocarbons present in a drilling waste-polluted soil. J Environ Sci & Health Part A, 39 (6); 2004. p. 1535-1545.
99. US EPA 3500B. Organic extraction and sample preparation. SW 846 Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. (Revision 2); 1996.
100. Later D, Lee M, Bartle D, Kong R y Vassilaros D. Chemical class separation and characterization of organic compounds in synthetic fuels. Anal Chem; 1981. p. 53 (11): 1612-1620.
101. US EPA 3600C. Cleanup. SW 846 Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. (Revision 3); 1996.
102. US EPA 3610B. Alumina Cleanup. SW 846 Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. (Revision 2) ; 1996.
103. US EPA 3611B. Alumina column cleanup and separation of petroleum wastes. SW 846 Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. (Revision 2) ; 1996.
104. US EPA 821B (Method 1664). N-hexane extractable material (HEM) and silica gel treated N-hexane extractable material (SGTHEM) by extraction and gravimetry (oil and grease and total petroleum hydrocarbons); 1995.
105. Cervantes G E. Estudio de la población asociada a la degradación de la fracción asfáltica y aromática presentes en un suelo contaminado. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México; 2001.
106. ASTM D6560. Standard test method for determination of asphaltenes (heptane insolubles) in crude petroleum and petroleum products; 2000.

107. US EPA 8440. Total recoverable petroleum hydrocarbons by infrared spectrophotometry. SW 846 Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. (Revisión 0); 1996.
108. US EPA 8015B. Nonhalogenated organics using GC/FID. SW 846 Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. (Revision 2); 1996.
109. US EPA 8270C. Semi-volatile organic compounds by chromatography/ mass spectrometry (GC/MS). SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. (Revision 3); 1996.
110. Ministerio del Ambiente (MINAM). “Guía para el muestreo de suelos”; 2014.
111. A.O.A.C Official methods of analysis. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicados a remediación, 13th edition; 1984.
112. Reynolds R J y Thompson K C. Atómica absorción, fluorescencia, y la llama espectroscopia de emisión: un enfoque práctico. Nueva York: Wiley; 1978.
113. Uden P C. Elemento específico cromatográfico detección por espectrometría de emisión atómica. Columbus, OH: Sociedad Americana de Química; 1992.
114. Narváez M y Martínez M. Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos, aisladas a partir de sedimentos del Caribe colombiano. Bol Invest Mar Cost Colombia; 2008. p. 37 (1): 63-77.
115. Mery R. Determinación manual de la textura de suelos mediante la técnica del “tacto”; 1980.
116. Zavala Castro J E. Manual de técnicas básicas de Biología Molecular; 2005.
117. Stephen F. Altschul et al., Basic Local Alignment Search Tool. J. Mol. Biol; 1990, 215:403-410.
118. Bases de datos de interés en bioquímica. Disponible en: <http://www.uam.es/departamentos/ciencias/quimica/estruct/alcami/herramientas/guiones/guion-bio.pdf>
119. Velasco Trejo J A. Tecnologías de remediación para suelos contaminados; 2002.
120. Carrillo J A, Hernández A y Saavedra C L. Obtención de un pool de microorganismos mediante liofilización para optimizar cultivos; 2011.

ANEXOS

ANEXO 01

Medio Mínimo de Goldman	
Fosfato ácido di potásico	18 g
Fosfato diácido de potasio	6 g
Sulfato de Magnesio	0.02 g
Sulfato diamónico	4 g
Etanol	20 mL
Agua Destilada	1000 mL
pH- final	7.0
Extracto de levadura	3%

Esterilización a 121°C por 15 minutos

ANEXO 02

Medio Mineral de Mills	
Cloruro de Sodio	24 g
Cloruro de Potasio	0.7 g
Fosfato diácido de potasio	2.0 g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	1.0 g
Fosfato ácido di sódico	3.0 g
Nitrato de Amonio	1.0 g
Agua Destilada	1000 mL
Petróleo crudo	10 mL
pH- final	7.0

Esterilización a 121°C por 15 minutos

ANEXO 03

Datos de Análisis Físicoquímicos del suelo – Nitrógeno y Nitritos



Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa Perú

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

INFORME DE ENSAYO LAS-17-00776

Pág: 1/2

Hoja de datos

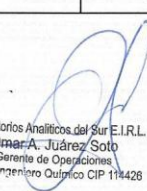
Señores: ANGELA FABIOLA VARGAS MOLINA
Dirección: AV: PUMACAHUA 407 CERRO VIEJO CERRO COLORADO AREQUIPA
Atención: ANGELA FABIOLA VARGAS MOLINA
Proyecto: Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos totales de petróleo (HTP) mediante el método de biopilas y el de compostaje.

Producto(s) Declarado(s): Suelos
Nro de muestras: 3
Muestreo a cargo de(l): ANGELA FABIOLA VARGAS MOLINA
Registro de muestreo: 003-17
Fecha de recepción: 19/01/2017
Fecha de ensayo: 19/01/2017
Fecha de emisión: 15/02/2017
Observaciones: -----

Método de ensayo aplicado

*7064 Ensayo de Nitrógeno total por Destilación - Fotometría
*7081 Método de ensayo para Nitritos en suelos Fotometría

Cod Int. #	Nombre de muestra	Lugar de muestreo	Punto de muestreo y/o coordenadas Coordenadas UTM Este / Norte	Fecha de muestreo	Hora de muestreo
SD17000003	SUPERFICIE	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE / CERRO COLORADO / AREQUIPA / AREQUIPA	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE	09/01/17	08:00 a.m.
SD17000004	MEDIDO	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE / CERRO COLORADO / AREQUIPA / AREQUIPA	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE	09/01/17	08:00 a.m.
SD17000005	PROFUNDO	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE / CERRO COLORADO / AREQUIPA / AREQUIPA	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE	09/01/17	08:00 a.m.


Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
Omar A. Juárez Soto
Gerente de Operaciones
M. Sc. Ingeniero Químico CIP 114428

^m<Valor numérico> = Límite de detección del método, ⁿ<Valor Numérico> = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.



Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa Perú

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com


INFORME DE ENSAYO LAS-17-00776

Hoja de resultados

15/02/2017

Pág.: 2/2

Código Interno #	Nombre de Muestra	*7064	*7081
		N mg/Kg	NO2 ⁻ mg/Kg
SD17000003	SUPERFICIE	16,183	0,270
SD17000004	MEDIO	9,728	0,226
SD17000005	PROFUNDO	11,707	0,170


Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
Omar A. Juárez Soto
Gerente de Operaciones
Ingeniero Químico C.P. 114426

*<Valor numérico> = Límite de detección del método, **<Valor Numérico> = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.

ANEXO 04

Datos de Análisis Físicoquímicos del suelo – Metales, Amonio, Nitratos, Sulfatos y HTP's



Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa Perú / Apartado 2102

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582 www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

INFORME DE ENSAYO LAS-17-00574

Pág: 1/5

Hoja de datos

Señores: ANGELA FABIOLA VARGAS MOLINA
 Dirección: AV: PUMACAHUA 407 CERRO VIEJO CERRO COLORADO AREQUIPA
 Atención: ANGELA FABIOLA VARGAS MOLINA
 Proyecto: Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos totales de petróleo (HTP) mediante el método de biopilas y el de compostaje.

Producto(s) Declarado(s): Suelos
 Nro de muestras: 3
 Muestreo a cargo de(l): ANGELA FABIOLA VARGAS MOLINA
 Registro de muestreo: 003-17
 Fecha de recepción: 19/01/2017
 Fecha de ensayo: 19/01/2017
 Fecha de emisión: 01/02/2017
 Observaciones : -----

Metodo de ensayo aplicado

*7071 Método de Ensayo para Hidrocarburos totales de petroleo por extracción en suelos
 *7003 EPA 200.7 Determinación de metales y elementos traza en suelos y sedimentos por ICP -AES, Revisión 4.4.
 *7061 Ensayo de Amonio por Extracción selectiva - Fotometría en suelos
 *7031 Método de ensayo para Nitratos en suelos Fotometría
 *7080 Ensayo de Sulfatos en suelos por Digestión específica - UV Vis

Cod Int. #	Nombre de muestra	Lugar de muestreo	Punto de muestreo y/o coordenadas Coordenadas UTM Este / Norte	Fecha de muestreo	Hora de muestreo
SD17000003	SUPERFICIE	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE / CERRO COLORADO / AREQUIPA / AREQUIPA	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE	09/01/17	08:00 a.m.
SD17000004	MEDIDO	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE / CERRO COLORADO / AREQUIPA / AREQUIPA	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE	09/01/17	08:00 a.m.
SD17000005	PROFUNDO	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE / CERRO COLORADO / AREQUIPA / AREQUIPA	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE	09/01/17	08:00 a.m.



Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
Omar A. Juárez Soto
Gerente de Operaciones
M. Sc. Ingeniero Químico CIP 114428

¹<Valor numérico> = Límite de detección del método, ²<Valor Numérico> = Límite de cuantificación del método.
 Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.
 Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.



Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa Perú / Apartado 2102

Tel: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

INFORME DE ENSAYO LAS-17- 00574

Hoja de resultados

01/02/2017

Pág.: 2/5

Código Interno #	Nombre de Muestra	7003	7003	7003	7003	7003	7003	7003	7003	7003	7003
		Ag MT mg/Kg	Al MT mg/Kg	As MT mg/Kg	B MT mg/Kg	Ba MT mg/Kg	Be MT mg/Kg	Ca MT mg/Kg	Cd MT mg/Kg	Ce MT mg/Kg	Co MT mg/Kg
SD17000003	SUPERFICIE	≤0.24	5332.59	≤0.12	≤0.53	146.3375	≤0.0079	> 10 000	2.585821	19.00961	3.631598
SD17000004	MEDIO	≤0.24	4219.741	≤0.12	≤0.53	104.6998	≤0.0079	3080.53	1.971523	28.2415	4.553412
SD17000005	PROFUNDO	≤0.24	5896.349	≤0.12	≤0.53	118.9902	≤0.0079	2038.079	2.145019	25.85939	5.804248

Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
Omar A. Juárez Seto
Gerente de Operaciones
M. Sc. Ingeniero Químico CIP 114428

nd<Valor numérico> = Límite de detección del método, nd<Valor Numérico> = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.



Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa Perú / Apartado 2102

Tel: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

INFORME DE ENSAYO LAS-17- 00574

Hoja de resultados

01/02/2017

Pág.: 3/5

Código Interno #	Nombre de Muestra	7003	7003	7003	7003	7003	7003	7003	7003	7003	7003
		Cr MT mg/Kg	Cu MT mg/Kg	Fe MT mg/Kg	Hg MT mg/Kg	K MT mg/Kg	Li MT mg/Kg	Mg MT mg/Kg	Mn MT mg/Kg	Mo MT mg/Kg	Na MT mg/Kg
SD17000003	SUPERFICIE	20.93784	145.9836	9264.954	0.984602	1214.057	5.925039	2148.35	130.3987	5.853342	2223.038
SD17000004	MEDIO	4.364898	29.46378	8076.591	*<0.041	1212.536	2.033192	1528.996	90.21163	*<0.038	399.7835
SD17000005	PROFUNDO	4.500583	27.41977	9187.807	*<0.041	1479.147	1.731962	1615.502	126.5922	*<0.038	507.2982


Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
Omar A. Juárez Soto
Gerente de Operaciones
M. Sc. Ingeniero Químico CIP 114423

*<Valor numérico = Límite de detección del método, **<Valor Numérico = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.



Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa Perú / Apartado 2102

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

INFORME DE ENSAYO LAS-17- 00574

Hoja de resultados

01/02/2017

Pág.: 4/5

Código Interno #	Nombre de Muestra	7003	7003	7003	7003	7003	7003	7003	7003	7003	7003
		Ni MT mg/Kg	P MT mg/Kg	Pb MT mg/Kg	Sb MT mg/Kg	Se MT mg/Kg	SiO ₂ MT mg/Kg	Sn MT mg/Kg	Sr MT mg/Kg	Ti MT mg/Kg	Ti MT mg/Kg
SD17000003	SUPERFICIE	17.86884	1965.781	81.06188	3.537626	≤0.2	856.3328	5.255968	78.57108	275.5306	≤0.13
SD17000004	MEDIO	4.283312	656.8402	5.234208	0.533004	≤0.2	441.9617	≤0.085	36.58115	559.0129	≤0.13
SD17000005	PROFUNDO	4.807078	636.2423	3.452208	≤0.049	≤0.2	515.3107	≤0.085	33.57047	705.4735	≤0.13

Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
Omar A. Juárez Soto
Gerente de Operaciones
M. Sc. Ingeniero Químico CIP 114423

^m<Valor numérico> = Límite de detección del método, ⁿ<Valor Numérico> = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.



Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa Perú / Apartado 2102

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

INFORME DE ENSAYO LAS-17- 00574

Hoja de resultados

01/02/2017

Pág.: 5/5

Código Interno #	Nombre de Muestra	7003 V MT mg/Kg	7003 Zn MT mg/Kg	*7071 TPH mg/Kg	*7061 N'NH4 mg/Kg	*7080 SO4= mg/Kg	*7031 NO3= mg/Kg
SD17000003	SUPERFICIE	13.71943	607.0871	75979.3	8.93	1844	31.6
SD17000004	MEDIO	26.03386	26.85932	733.1	4.77	98	21.5
SD17000005	PROFUNDO	30.06449	15.36879	257.5	5.48	206	27.2



Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
Oscar A. Juárez Soto
Gerente de Operaciones
M. Sc. Ingeniero Químico CIP 114426

*<Valor numérico> = Límite de detección del método, **<Valor Numérico> = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.

ANEXO 05

Decreto Supremo N° 002-2013-MINAM

El Peruano
Lima, lunes 25 de marzo de 2013

NORMAS LEGALES

491497

Que, el artículo 31° de la Ley N° 28611, define al Estándar de Calidad Ambiental (ECA) como la medida que establece el nivel de concentración o del grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos, presentes en el aire, agua o suelo en su condición de cuerpo receptor, que no representa riesgo significativo para la salud de las personas ni al ambiente. El ECA es obligatorio en el diseño de las normas legales y las políticas públicas; así como referente obligatorio en el diseño y aplicación de todos los instrumentos de gestión ambiental;

Que, de conformidad con el literal d) del artículo 7° del Decreto Legislativo N° 1013, que aprueba la Ley de Creación, Organización y Funciones del Ministerio del Ambiente, este Ministerio tiene como función específica elaborar los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) y Límites Máximos Permisibles (LMP), que deberán contar con la opinión del sector correspondiente, debiendo ser aprobados o modificados mediante Decreto Supremo;

Que, la Política Nacional del Ambiente, aprobada mediante Decreto Supremo N° 012-2009-MINAM, consigna entre los Lineamientos de Política del Eje 2: Gestión Integrada de la Calidad Ambiental, referidos al control integrado de la contaminación, el de contar con parámetros de contaminación para el control y mantenimiento de la calidad del aire, agua y suelo;

Que, mediante Resolución Ministerial N° 225-2012-MINAM, se aprobó el Plan de Estándares de Calidad Ambiental (ECA) y Límites Máximos Permisibles (LMP) para el Período 2012-2013, estando programada la elaboración del ECA para Suelo;

Que, asimismo, la Agenda Nacional de Acción Ambiental – AgendAmbiente 2013-2014, aprobada por Resolución Ministerial N° 026-2013-MINAM, establece en su Objetivo 9 – Prevenir y Disminuir la Contaminación de los Suelos, la aprobación e implementación de los Estándares de Calidad Ambiental para Suelo, por el Ministerio del Ambiente;

Que, en el marco de lo dispuesto en el Reglamento sobre Transparencia, Acceso a la Información Pública Ambiental y Participación y Consulta Ciudadana en Asuntos Ambientales aprobada por Decreto Supremo N° 002-2009-MINAM, la propuesta normativa fue sometida a Consulta Pública, habiéndose recibido aportes y comentarios para su formulación;

Que, en ese sentido, corresponde aprobar los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo, conforme a lo establecido en el artículo 7° del Decreto Legislativo N° 1013;

De conformidad con lo dispuesto en la Ley N° 28611, Ley General del Ambiente, el Decreto Legislativo N° 1013, que aprueba la Ley de Creación, Organización y Funciones del Ministerio del Ambiente y el artículo 118° de la Constitución Política del Perú.

DECRETA:

Artículo 1°.- Aprobación de los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo

Apruébese los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo, contenidos en el Anexo I del presente Decreto Supremo.

Artículo 2°.- Ámbito de Aplicación

Los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo son aplicables a todo proyecto y actividad, cuyo desarrollo dentro del territorio nacional genere o pueda generar riesgos de contaminación del suelo en su emplazamiento y áreas de influencia.

Artículo 3°.- Definiciones

Para los fines de la presente norma, se utilizarán las definiciones contenidas en el Anexo II del presente Decreto Supremo.

Artículo 4°.- Prohibición de mezcla de suelos

Prohíbese la adición de un suelo no contaminado a un suelo contaminado, con la finalidad de reducir la concentración de uno o más contaminantes para alcanzar los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo.

Artículo 5°.- Instrumentos de Gestión Ambiental y el ECA para Suelo

Los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo son referente obligatorio en el diseño y aplicación de

AMBIENTE

Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo

**DECRETO SUPREMO
N° 002-2013-MINAM**

EL PRESIDENTE DE LA REPÚBLICA

CONSIDERANDO:

Que, el numeral 22 del artículo 2° de la Constitución Política del Perú establece que toda persona tiene derecho a gozar de un ambiente equilibrado y adecuado al desarrollo de su vida;

Que, según el artículo I del Título Preliminar de la Ley N° 28611, Ley General del Ambiente, toda persona tiene el derecho irrenunciable a vivir en un ambiente saludable, equilibrado y adecuado para el pleno desarrollo de la vida y el deber de contribuir a una efectiva gestión ambiental y de proteger el ambiente, así como a sus componentes asegurando particularmente la salud de las personas en forma individual y colectiva, la conservación de la diversidad biológica, el aprovechamiento sostenible de los recursos naturales y el desarrollo sostenible del país;

Que, el artículo 3° de la Ley N° 28611, referido al rol de Estado en materia ambiental, dispone que éste a través de sus entidades y órganos correspondientes diseña y aplica, entre otros, las normas que sean necesarias para garantizar el efectivo ejercicio de los derechos y el cumplimiento de las obligaciones y responsabilidades contenidas en dicha Ley;

491498

NORMAS LEGALES

El Peruano
Lima, lunes 25 de marzo de 2013

todos los instrumentos de gestión ambiental, lo que incluye planes de descontaminación de suelos o similares.

Artículo 6°.- Aplicación del ECA para Suelo para proyectos nuevos

Para el caso de proyectos nuevos, los titulares están obligados a determinar como parte de su Instrumento de Gestión Ambiental, la concentración de las sustancias químicas, que caracteriza sus actividades extractivas, productivas o de servicios, en el suelo de su emplazamiento y áreas de influencia, estén o no comprendidas en el Anexo I de la presente norma, lo que constituirá su nivel de fondo.

En base a lo señalado en el párrafo precedente, se establecerán los mecanismos y acciones a incluir en la estrategia de manejo ambiental, medidas o planes del Instrumento de Gestión Ambiental correspondiente.

Artículo 7°.- Aplicación de ECA para Suelo para actividades en curso

Los titulares con actividades en curso deberán actualizar sus instrumentos de gestión ambiental aprobados por la autoridad competente, en concordancia con los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo, en un plazo no mayor de doce (12) meses, contados a partir de la vigencia del presente Decreto Supremo.

Artículo 8°.- Planes de Descontaminación de Suelos (PDS)

Cuando se determine la existencia de un sitio contaminado derivado de las actividades extractivas, productivas o de servicios, el titular debe presentar el Plan de Descontaminación de Suelos (PDS), el cual es aprobado por la autoridad competente.

El PDS determina las acciones de remediación correspondientes, tomando como base los estudios de caracterización de sitios contaminados, en relación a las concentraciones de los parámetros regulados en el Anexo I. En caso el nivel de fondo de un sitio excediera el ECA correspondiente para un parámetro determinado, se utilizará dicho nivel como concentración objetivo de remediación.

Para sitios afectados mayores a 10000 m2, se podrá tomar como base los niveles de remediación que se determinen del estudio de evaluación de riesgos a la salud y al ambiente, a cargo del titular de la actividad. Para el caso de la evaluación de riesgos a la salud humana, la autoridad competente requerirá la opinión técnica favorable de la Autoridad de Salud, previa a la aprobación del PDS.

Las entidades de fiscalización ambiental o autoridades competentes podrán identificar sitios contaminados y exigir, a través de estas últimas, la elaboración de Planes de Descontaminación de Suelos, que deberán ser presentados en un plazo no mayor de doce (12) meses, contados desde la fecha de notificación al titular de la actividad extractiva, productiva o de servicios, responsable de la implementación de las medidas de remediación correspondientes.

El plazo para la ejecución del PDS no será mayor a tres (03) años, contados desde la fecha de aprobación del mismo. Solo por excepción y en caso técnicamente justificado, se podrá ampliar este plazo por un (01) año como máximo.

Artículo 9°.- Descontaminación de Suelos derivados de una emergencia

En casos de emergencia, el titular deberá activar el Plan de Contingencia correspondiente, procediendo a ejecutar inmediatamente las acciones de remediación destinadas a reducir los impactos ocasionados. En caso el titular de la actividad no contara con este instrumento, ello no lo exime de la ejecución inmediata de medidas destinadas a cumplir con los ECA de suelo vigentes. En ambos casos señalados anteriormente, el cronograma de remediación es remitido a la entidad de fiscalización ambiental correspondiente para el seguimiento del cumplimiento del mismo.

Artículo 10°.- Planes de Descontaminación de Suelos (PDS) derivados de actividades extractivas, productivas o de servicios

Los titulares con actividades en curso, cuenten o no con un instrumento de gestión ambiental aprobado o vigente, deberán realizar un muestreo exploratorio del

suelo dentro del emplazamiento y áreas de influencia de sus actividades extractivas, productivas o de servicios, debiendo comunicar los resultados obtenidos a la autoridad competente y a la entidad de fiscalización ambiental correspondiente.

Si como resultado del muestreo señalado encontrasen sitios contaminados, deberán presentar el Plan de Descontaminación de Suelos respectivo a la autoridad competente para su aprobación, en un plazo no mayor de doce (12) meses, contados a partir de la vigencia del presente Decreto Supremo.

Artículo 11°.- Análisis de Muestras

El análisis de las muestras de suelo deberá ser realizado por laboratorios acreditados ante el Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual (INDECOPI), para los métodos de ensayo señalados en el Anexo I de la presente norma. En tanto no se disponga de laboratorios acreditados se utilizarán los laboratorios aceptados expresamente por las autoridades competentes.

Artículo 12°.- Contaminantes no comprendidos en el Anexo I

En caso que la actividad genere o maneje sustancias químicas no comprendidas en el Anexo I, se aplicará lo establecido en el numeral 33.3 del artículo 33° de la Ley N° 28611, Ley General del Ambiente.

Artículo 13°.- Incumplimiento de las obligaciones

El incumplimiento de las obligaciones comprendidas en la presente norma constituye infracciones administrativas sancionables por las entidades de fiscalización ambiental, para lo cual se encuentran facultadas a ejercer las acciones de supervisión y fiscalización correspondientes.

La responsabilidad administrativa será objetiva e independiente de la responsabilidad civil o penal que pudiera derivarse por los mismos hechos.

Artículo 14°.- Fondos de Garantía

Las autoridades competentes deben establecer mecanismos para generar fondos de garantía que aseguren el cumplimiento del Plan de Descontaminación de Suelos por parte de los titulares de las actividades extractivas, productivas y de servicios.

Artículo 15°.- Revisión del ECA para suelo

El Ministerio del Ambiente complementará o modificará, mediante Decreto Supremo, lo dispuesto en la presente norma.

Artículo 16°.- Vigencia

El presente Decreto Supremo entrará en vigencia al día siguiente de su publicación en el Diario Oficial El Peruano.

Artículo 17°.- Refrendo

El presente Decreto Supremo será refrendado por el Ministro del Ambiente.

DISPOSICIONES COMPLEMENTARIAS FINALES

Primera.- El Ministerio del Ambiente aprobará la Guía para Muestreo de Suelos y la Guía para la Elaboración de Planes de Descontaminación de Suelos en un plazo no mayor de tres (03) meses, contados a partir de la vigencia del presente Decreto Supremo.

Segunda.- El Ministerio del Ambiente aprobará la Guía para la Elaboración de Estudios de Evaluación de Riesgos a la Salud y el Ambiente, en un plazo no mayor de seis (06) meses, contados a partir de la vigencia del presente Decreto Supremo, sin perjuicio del cumplimiento de los Planes de Descontaminación de Suelos aprobados.

Tercera.- Para el caso de pasivos ambientales de hidrocarburos y de minería, se utilizarán los ECA para suelo aprobados mediante la presente norma, bajo los procedimientos establecidos en la Ley N° 29134, Ley que Regula los Pasivos Ambientales del Subsector Hidrocarburos y su Reglamento, así como en la Ley N°28271, Ley que regula los pasivos ambientales de la actividad minera, su Reglamento y la Ley N° 28090, Ley que regula el Cierre de minas y su Reglamento.

El Peruano

Lima, lunes 25 de marzo de 2013



NORMAS LEGALES

491499

Cuarta.- El Ministerio del Ambiente, mediante Resolución Ministerial, dictará las normas complementarias para la mejor aplicación del presente Decreto Supremo.

Dado en la Casa de Gobierno, en Lima, a los veinticuatro días del mes de marzo del año dos mil trece.

OLLANTA HUMALA TASSO
Presidente Constitucional de la República

MANUEL PULGAR-VIDAL OTALORA
Ministro del Ambiente

ANEXO I

**ESTÁNDARES DE CALIDAD
AMBIENTAL PARA SUELO**

N°	Parámetros	Usos del Suelo			Método de ensayo
		Suelo Agrícola	Suelo Residencial/ Parques	Suelo Comercial/ Industrial/ Extractivos	
I Orgánicos					
1	Benceno (mg/kg MS)	0,03	0,03	0,03	EPA 8260-B EPA 8021-B
2	Tolueno (mg/kg MS)	0,37	0,37	0,37	EPA 8260-B EPA 8021-B
3	Etilbenceno (mg/kg MS)	0,082	0,082	0,082	EPA 8260-B EPA 8021-B
4	Xileno (mg/kg MS)	11	11	11	EPA 8260-B EPA 8021-B
5	Naftaleno (mg/kg MS)	0,1	0,6	22	EPA 8260-B
6	Fracción de hidrocarburos F1 (C5-C10) (mg/kg MS)	200	200	500	EPA 8015-B
7	Fracción de hidrocarburos F2 (C10-C28) (mg/kg MS)	1 200	1 200	5 000	EPA 8015-M
8	Fracción de hidrocarburos F3 (C28-C40) (mg/kg MS)	3 000	3 000	6 000	EPA 8015-D
9	Benzo(a) pireno (mg/kg MS)	0,1	0,7	0,7	EPA 8270-D
10	Bifenilos policlorados - PCB (mg/kg MS)	0,5	1,3	33	EPA 8270-D
11	Aldrin (mg/kg MS) _m	2	4	10	EPA 8270-D
12	Endrin (mg/kg MS) _m	0,01	0,01	0,01	EPA 8270-D
13	DDT (mg/kg MS) _m	0,7	0,7	12	EPA 8270-D
14	Heptacloro (mg/kg MS) _m	0,01	0,01	0,01	EPA 8270-D
II Inorgánicos					
15	Cianuro libre (mg/kg MS)	0,9	0,9	8	EPA 9013-A/ A/PHA- A/WWA- WEF 4500 CN F
16	Arsénico total (mg/kg MS) _m	50	50	140	EPA 3050-B EPA 3051
17	Bario total (mg/kg MS) _m	750	500	2 000	EPA 3050-B EPA 3051
18	Cádmio total (mg/kg MS) _m	1,4	10	22	EPA 3050-B EPA 3051
19	Cromo VI (mg/kg MS)	0,4	0,4	1,4	DIN 19734
20	Mercurio total (mg/kg MS) _m	6,6	6,6	24	EPA 7471-B
21	Plomo total (mg/kg MS) _m	70	140	1 200	EPA 3050-B EPA 3051

EPA: Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos)

DIN: German Institute for Standardization

MS: materia seca a 105 °C, excepto para compuestos orgánicos y mercurio no debe exceder 40 °C, para cianuro libre se debe realizar el secado de muestra fresca en una estufa a menos de 10 °C por 4 días. Luego de secada la muestra debe ser tamizada con malla de 2 mm. Para el análisis se emplea la muestra tamizada < 2mm.

Nota 1: Plaguicidas regulados debido a su persistencia en el ambiente, en la actualidad está prohibido su uso, son Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP).

Nota 2: Concentración de metales totales.

ANEXO II

DEFINICIONES

Autoridad competente: Entidad del Estado del nivel nacional, regional o local que con arreglo a sus atribuciones y según lo disponga su normativa específica ejerce competencia en materia de evaluación de impacto ambiental, en el marco de lo establecido por la Ley N° 27446, Ley del Sistema Nacional de Evaluación de Impacto Ambiental, su Reglamento aprobado por Decreto Supremo N° 019-2009-MINAM, y demás disposiciones complementarias o modificatorias.

Caracterización de sitios contaminados: Determinación cualitativa y cuantitativa de los contaminantes químicos o biológicos presentes, provenientes de materiales o residuos peligrosos, para estimar la magnitud y tipo de riesgos que conlleva dicha contaminación.

Contaminante: Cualquier sustancia química que no pertenece a la naturaleza del suelo o cuya concentración excede la del nivel de fondo susceptible de causar efectos nocivos para la salud de las personas o el ambiente.

Emergencia: Cuando la contaminación del sitio derive de una circunstancia o evento, indeseado o inesperado, que ocurra repentinamente y que traiga como resultado la liberación no controlada, incendio o explosión de uno o varios materiales peligrosos o residuos peligrosos que afecten la salud humana o el ambiente, de manera inmediata.

Entidad de fiscalización ambiental: Entidad del Estado del nivel nacional, regional o local que tiene atribuida de forma expresa alguna o todas las funciones comprendidas en el macroproceso de fiscalización ambiental (evaluación, supervisión, fiscalización y sanción), en el marco de lo establecido por la Ley N° 29325, Ley del Sistema Nacional de Evaluación y Fiscalización Ambiental, y demás disposiciones complementarias o modificatorias.

Evaluación de riesgos a la salud y el ambiente: Es el estudio que tiene por objeto definir si la contaminación existente en un sitio representa un riesgo tanto para la salud humana como para el ambiente, así como los niveles de remediación específicos del sitio en función del riesgo aceptable y las acciones de remediación que resulten necesarias.

Fracción de hidrocarburos F1 o hidrocarburos fracción ligera: Mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contengan entre cinco y diez átomos de carbono (C₅ a C₁₀). Los hidrocarburos fracción ligera deben analizarse en los siguientes productos contaminantes: mezcla de productos desconocidos derivados del petróleo, petróleo crudo, gasavión, gasolvente, gasolinas, gas nafta.

Fracción de hidrocarburos F2 o hidrocarburos fracción media: Mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contengan entre diez y veintiocho átomos de carbono (C₁₀ a C₂₈). Los hidrocarburos fracción media deben analizarse en los siguientes productos contaminantes: mezcla de productos desconocidos derivados del petróleo, petróleo crudo, gasóleo, diesel, turbosina, queroseno, mezcla de creosota, gasavión, gasolvente, gasolinas, gas nafta.

Fracción de hidrocarburos F3 o hidrocarburos fracción pesada: Mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contengan entre veintiocho y cuarenta átomos de carbono (C₂₈ a C₄₀). Los hidrocarburos fracción pesada deben analizarse en los siguientes productos contaminantes: mezcla de productos desconocidos derivados del petróleo, petróleo crudo, combustóleo, parafinas, petrolatos, aceites derivados del petróleo.

Nivel de fondo: Concentración en el suelo de los químicos regulados que no fueron generados por la actividad objeto de análisis y que se encuentran en el suelo de manera natural o fueron generados por alguna fuente antropogénica ajena a la considerada.

Plan de Descontaminación de Suelos: Instrumento de gestión ambiental que tiene por finalidad remediar los impactos ambientales originados por una o varias actividades pasadas o presentes en los suelos. Los tipos de acciones de remediación que se podrán aplicar,

491500

 **NORMAS LEGALES**

El Peruano
Lima, lunes 25 de marzo de 2013

sola o en combinaciones, son: acciones de remediación para la eliminación de los contaminantes del sitio, acciones para evitar la dispersión de los contaminantes, acciones para el control del uso del suelo, y acciones para monitoreo del sitio contaminado. La presentación del Plan de Descontaminación de Suelos no exime de la responsabilidad de elaborar y presentar ante la autoridad competente, los demás instrumentos de gestión ambiental propios de la actividad.

Parámetro: Cualquier elemento o sustancia química del suelo que define su calidad y que se encuentra regulado por el presente Decreto Supremo.

Remediación: Tarea o conjunto de tareas a desarrollarse en un sitio contaminado con la finalidad de eliminar o reducir contaminantes, a fin de asegurar la protección de la salud humana y la integridad de los ecosistemas.

Sitio contaminado: Aquel suelo cuyas características químicas han sido alteradas negativamente por la presencia de sustancias químicas contaminantes depositadas por la actividad humana, en concentraciones tal que en función del uso actual o previsto del sitio y sus alrededores represente un riesgo a la salud humana o el ambiente.

Suelo: Material no consolidado compuesto por partículas inorgánicas, materia orgánica, agua, aire y organismos, que comprende desde la capa superior de la superficie terrestre hasta diferentes niveles de profundidad.

Suelo agrícola: Suelo dedicado a la producción de cultivos, forrajes y pastos cultivados. Es también aquel suelo con aptitud para el crecimiento de cultivos y el desarrollo de la ganadería. Esto incluye tierras clasificadas como agrícolas, que mantienen un hábitat para especies permanentes y transitorias, además de flora y fauna nativa, como es el caso de las áreas naturales protegidas.

Suelo comercial: Suelo en el cual, la actividad principal que se desarrolla está relacionada con operaciones comerciales y de servicios.

Suelo industrial/extractivo: Suelo en el cual, la actividad principal que se desarrolla abarca la extracción y/o aprovechamiento de recursos naturales (actividades mineras, hidrocarburos, entre otros) y/o, la elaboración, transformación o construcción de bienes.

Suelo residencial/parques: Suelo ocupado por la población para construir sus viviendas: incluyendo áreas verdes y espacios destinados a actividades de recreación y de esparcimiento.

916305-1

ANEXO 06

Secuenciación Molecular de Cepas

CEPA 3:

>KJ156326.1 Enterobacter hormaechei strain LAB 229 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

TGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTTGCTGACGAGTGGCG
ACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGA
ACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTCGGG
CCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACG
CTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCAACGG
AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGA
CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTC
GGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATGAGGTTAATAACCTT
GTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG
CGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTG
GGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAATT
CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAA
GGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGG
GTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCCGA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTA
CTCTTGACATCCAGAGAACTTA

CEPA 5:

>KT758606.1 Bacillus sonorensis strain HQB810 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GGACGGGGCGGCGTTCTATACATGCAAGTCGAGCGAACCGACGGGAGCTTG
CTCCCTTAGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGT
AAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGA
ACCGCATGGTTCAATTATAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGA
CCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGAT
GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGT
CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAACTCT

GTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAACAGGGCGGTGCCTTGACGGTA
CCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGT
TTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA
ACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGT
CTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTCTAAGTGTAGAGGGTTCCG
CCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTC
GCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCT
CTGACACCCCTAGAGATAGGGCT

CEPA 7:

>KX639818.1 *Citrobacter youngae* strain ZF2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GGGCATTGGCGGCAGCCTACACATGCAGTTCGAACGGTAGCACAGAGGAGCT
TGCTCCTTGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGC
CCGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTC
GCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAG
ATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTA
GCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGAT
GCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAG
CGAGGAGGAAGGCGTTGTGGTTAATAACCGCAACGATTGACGTTACTCGCA
GAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTG
CAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCA
AGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCGAAACTGG
CAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAG
ACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTG
GCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAA
CTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATG
GCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTTCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGC
CAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTT
ACGAGTAGGGCTACCACCGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACC
TCCCGAGAACAAGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTAATCCCGGATTGGAGC
CTGCAACTCGACTCCTTGAAGTCGGAATCCCTAGTAATCGTGGATCAAATG
CACGGGGAAAACGTTCCCGGGCCTGGTAACACCGCCGGTCAACACGGAG

CEPA 9:

>KY297819.1 Uncultured bacterium clone denovo18878 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
TACGGAGGGTGCGAGCGTTGATCGGAATAACTGGGCGTAAAGGGCACGCAG
GCGGGCTTTTAAGTGAGGTGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAATAGCAT
TTCAGACTGGGAGTCTAGAGTACTTTAGGGAGGGGTAGAATTCCACGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGCCTGCGAAGGCAGCCCAT
TGGGAATGTACTGACGCTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
```



ANEXO 07

Parámetro Controlado: pH

DIAS	Testigo	Exp 1	Exp 2	Exp 3
0	7.4	6.84	7.8	7.95
20	7.44	7.53	7.86	8.0
40	7.28	7.32	7.05	7.27

ANEXO 08

Parámetro Controlado: Humedad

DIAS	Testigo	Exp 1	Exp 2	Exp 3
0	22.6	25.2	25.5	25.1
20	23.2	27.8	28.3	27.9
40	24.9	29.4	30.6	28.7

ANEXO 09

Parámetro Controlado: Temperatura

DIAS	Testigo	Exp 1	Exp 2	Exp 3
0	20.1	20.1	20.5	20.2
20	20.7	20.5	20.6	20.9
40	21.7	21.4	21.2	21

ANEXO 10

Parámetro Controlado: Concentración de microorganismos

DIAS	Testigo	Exp 1	Exp 2	Exp 3
0	3.38E+05	9.73E+08	8.93E+08	8.31E+08
20	8.93E+05	8.62E+08	4.35E+08	5.68E+08
40	5.88E+04	2.25E+06	1.96E+06	3.74E+07

ANEXO 11

Parámetro Controlado: Concentración de HTP's

DIAS	Testigo	Exp 1	Exp 2	Exp 3
0	25654	28084	25633	27127
20	24319	23534	21147	24495
40	22626	17215	15918	26286



Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa Perú

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

INFORME DE ENSAYO LAS-17-01274

Pág: 1/1

Hoja de datos

Señores: ANGELA FABIOLA VARGAS MOLINA
Dirección: AV: PUMACAHUA 407 CERRO VIEJO CERRO COLORADO AREQUIPA
Atención: ANGELA FABIOLA VARGAS MOLINA
Proyecto: Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos totales de petróleo (HTP) mediante el método de biopilas y el de compostaje.

Producto(s) Declarado(s): Suelos

Nro de muestras: 3
Muestreo a cargo de(l): ANGELA FABIOLA VARGAS MOLINA
Registro de muestreo: 010-17
Fecha de recepción: 16/03/2017
Fecha de ensayo: 16/03/2017
Fecha de emisión: 22/03/2017
Observaciones : -----

Método de ensayo aplicado

*7071 Método de Ensayo para Hidrocarburos totales de petróleo por extracción en suelos

Cod Int. #	Nombre de muestra	Lugar de muestreo	Punto de muestreo y/o coordenadas Coordenadas UTM Este / Norte	Fecha de muestreo	Hora de muestreo	*7071 TPH mg/Kg
SD17000025	EXPERIMENTAL 1	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE / CERRO COLORADO / AREQUIPA / AREQUIPA	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE	15/03/17	10:00 a.m.	28084
SD17000026	EXPERIMENTAL 2	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE / CERRO COLORADO / AREQUIPA / AREQUIPA	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE	15/03/17	10:00 a.m.	25633
SD17000027	EXPERIMENTAL 3	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE / CERRO COLORADO / AREQUIPA / AREQUIPA	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE	15/03/17	10:00 a.m.	27127

[Firma manuscrita]
Laboratorios Analíticos del Sur E.N.R.L.
Socio: M. C. María Neiza
Calle: ...
Tel: ...

nd<Valor numérico> = Límite de detección del método, ^{bc}<Valor Numérico> = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.



Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa Perú

Tel: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

INFORME DE ENSAYO LAS-17-01727

Pág: 1/1

Hoja de datos

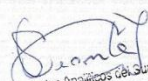
Señores: CCOLQUE CHOQUE YOBANA MARIBEL
Dirección: C.H. LTO CAYMA III - DEAN VALDIVIA MZ 09 LT 8 AREQUIPA - AREQUIPA
Atención: CCOLQUE CHOQUE YOBANA MARIBEL
Proyecto: Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos totales de petróleo (HTP) mediante el método de biopilas y el de compostaje

Nro de muestras: 3
Muestreo a cargo de(l): CCOLQUE CHOQUE YOBANA MARIBEL
Registro de muestreo: 013-17
Fecha de recepción: 06/04/2017
Fecha de ensayo: 06/04/2017
Fecha de emisión: 15/04/2017
Condiciones de recepción de la muestra:
Observaciones : -----

Método de ensayo aplicado

*7071 Método de Ensayo para Hidrocarburos totales de petróleo por extracción en suelos

Cod Int. #	Nombre de muestra	Lugar de muestreo	Punto de muestreo y/o coordenadas Coordenadas UTM Este / Norte	Fecha de muestreo	Hora de muestreo	*7071 TPH mg/Kg
SD17000031	EXPERIMENTAL 1	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE / CERRO COLORADO / AREQUIPA / AREQUIPA	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE	05/04/17	10:00 a.m.	23534,0
SD17000032	EXPERIMENTAL 2	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE / CERRO COLORADO / AREQUIPA / AREQUIPA	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE	05/04/17	10:00 a.m.	21147,0
SD17000033	EXPERIMENTAL 3	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE / CERRO COLORADO / AREQUIPA / AREQUIPA	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE	05/04/17	10:00 a.m.	24495,0


Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
Sixto Vicente Juárez Neira
Gerente General
Ing. Químico CIP 19474

*"Valor numérico" = Límite de detección del método, "Valor Numérico" = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.
Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.



Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa Perú

Tel: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

INFORME DE ENSAYO LAS-17-02063

Pág: 1/1

Hoja de datos

Señores: CCOLQUE CHOQUE YOBANA MARIBEL
Dirección: C.H. LTO CAYMA III - DEAN VALDIVIA MZ 09 LT 8 AREQUIPA - AREQUIPA
Atención: CCOLQUE CHOQUE YOBANA MARIBEL
Proyecto: *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos totales de petróleo (HTP) mediante el método de biopilas y el de compostaje*

Nro de muestras: 3
Muestreo a cargo de(l): CCOLQUE CHOQUE YOBANA MARIBEL
Registro de muestreo: 015-17
Fecha de recepción: 26/04/2017
Fecha de ensayo: 26/04/2017
Fecha de emisión: 02/05/2017
Condiciones de recepción de la muestra:
Observaciones : ----

Método de ensayo aplicado

*7071 Método de Ensayo para Hidrocarburos totales de petróleo por extracción en suelos

Cod Int. #	Nombre de muestra	Lugar de muestreo	Punto de muestreo y/o coordenadas Coordenadas UTM Este / Norte	Fecha de muestreo	Hora de muestreo	*7071 TPH mg/Kg
SD17000040	EXPERIMENTAL 1	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE / CERRO COLORADO / AREQUIPA / AREQUIPA	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE	26/04/17	10:00 a.m.	17215,0
SD17000041	EXPERIMENTAL 2	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE / CERRO COLORADO / AREQUIPA / AREQUIPA	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE	26/04/17	10:00 a.m.	15918,0
SD17000042	EXPERIMENTAL 3	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE / CERRO COLORADO / AREQUIPA / AREQUIPA	UPIS MERCADO MAYORISTA MZ D LT 1 ZN B CONO NORTE	26/04/17	10:00 a.m.	26286,0

Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
Sixto Vicente Juárez Néira
Gerente General
Ing. Químico CIP 19474

"<Valor numérico" = Límite de detección del método. "Valor Numérico" = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.