

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO



FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“BIORREMEDIACION DEL SUELO CONTAMINADO CON
HIDROCARBUROS DE LA CENTRAL HIDROELÉCTRICA DEL
CAMPAMENTO SECOYA MEDIANTE LANDFARMIG”**

**Tesis de Grado Previo a la obtención del título de:
INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL
VIVIANA GABRIELA ARBOLEDA JÀCOME
VERÓNICA MERCEDES BRAVO BASANTES**

Riobamba * Ecuador

2008

*“Nosotras, **VIVIANA GABRIELA ARBOLEDA JÁCOME, VERÓNICA MERCEDES BRAVO BASANTES** somos responsables de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta tesis, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenecen a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo”*

VIVIANA GABRIELA ARBOLEDA JÁCOME

VERÓNICA MERCES BRAVO BASANTES

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BL	Blanco
Cd	Cadmio
cm	Centímetro
DINAPA	Dirección Nacional de Protección Ambiental
EPA	Agencia de Protección Ambiental
HAP`s	Hidrocarburos Aromáticos Totales
HCl	Ácido clorhídrico
Hg	Mercurio
HNO ₃	Ácido nítrico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
Kg	Kilogramo
Kg/m ³	Kilogramo por metro cúbico
m/s	Metro por segundo
mg/Kg	Miligramo por kilogramo
mm	Milímetro
mg/L	Miligramos por litro
mL	Mililitros
nm	Nanómetro
Ni	Níquel
ppm	Partes por millón
Pb	Plomo

pH	Potencial de hidrogeno
TEA	Aceptor Final de Electrones
TPH	Hidrocarburos Totales
UFC/g	Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo
%p/p	Porcentaje en peso
RAOHE	Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador
T-A	Tratamiento A
T- B	Tratamiento B
T- C	Tratamiento C
X	Media

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCION.....	18
CAPITULO I.....	22
1. MARCO TEÓRICO.....	23
1.1. Petróleo.....	23
1.2. Suelo como hábitad para los microorganismos.....	26
1.3. Contaminación de suelos. Implicación en su calidad.....	28
1.4. Microbiología de suelos.....	30
1.5. Mecanismos del suelo en la retención de metales.....	34
1.6. Transformación biológica de compuestos orgánicos.....	36
1.7. Fundamentos microbiológicos.....	38
1.8. Biodegradación.....	46
1.9. Biorremediación.....	48
1.10. Tecnología Landfarming.....	54
CAPITULO II.....	56
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
2.1. Descripción del área de trabajo.....	57
2.2. Materiales experimentales.....	59
2.3. Material de campo.....	60

2.4. Equipos.....	61
2.5. Métodos.....	62
2.6. Métodos analíticos.....	62
2.7. Métodos microbiológicos.....	65
2.8. Normas utilizadas.....	65
CAPITULO III.....	67
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	68
3.1. Metodología.....	68
3.2. Pruebas analíticas.....	70
3.3. Diseño experimental.....	78
CAPITULO IV.....	80
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	81
4.1. Caracterización del suelo contaminado.....	81
4.2. Pruebas de biorremediación.....	82
4.3. Eficiencia en la biorremediación de los hidrocarburos totales.....	91
4.4. Eficiencia de los tratamientos respecto al cadmio.....	92
4.5. Eficiencia de los tratamientos respecto al níquel.....	93
4.6. Eficiencia de los tratamientos respecto al plomo.....	94
4.7. Proyección de la biorremediación.....	95
CAPITULO V.....	97
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	98
5.1. Conclusiones.....	98

5.2. Recomendaciones.....	100
CAPITULO VI.....	101
RESUMEN.....	102
SUMARY.....	103
CAPITULO VII.....	104
BIBLIOGRAFÍA.....	105
ANEXOS.....	111

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro # 1 Concentración de TPH (mg/Kg) del tratamiento A.....	83
Cuadro # 2 Concentración de TPH (mg/Kg) del tratamiento B.....	85
Cuadro # 3 Concentración de TPH (mg/Kg) del tratamiento C.....	87
Cuadro # 4 Concentración de TPH (mg/Kg) del Blanco.....	89
Cuadro # 5 Proyección de la Biorremediación del T-A.....	95
Cuadro # 6 Proyección de la Biorremediación del T-B.....	95
Cuadro # 7 Proyección de la Biorremediación del T-C.....	95
Cuadro # 8 Proyección de la Biorremediación del BL.....	96

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico # 1 Biodegradación de TPH del T-A.....	84
Gráfico # 2 Biodegradación de TPH del T-B.....	86
Gráfico # 3 Biodegradación de TPH del T-C.....	88
Gráfico # 4 Biodegradación de TPH del BL.....	90
Gráfico # 5 Eficiencia de los tratamientos respecto a los TPH.....	91
Gráfico # 6 Eficiencia de los tratamientos respecto al Cadmio.....	92
Gráfico # 7 Eficiencia de los tratamientos respecto al Níquel.....	93
Gráfico # 8 Eficiencia de los tratamientos respecto al Plomo.....	94

ÍNDICES DE TABLAS

Tabla I	Actividades desarrolladas por los microorganismos del suelo.....	31
Tabla II	Valores normalmente observados en diferentes suelos y abonos orgánicos.....	33
Tabla III	Requerimientos y factores importantes para la biorremediación.....	52
Tabla IV	Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera.....	66
Tabla V	Códigos, tratamientos y repeticiones.....	79
Tabla VI	Variables Físicas, químicas y biológicas del suelo contaminado.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura # 1	Fases de crecimiento bacteriano.....	45
Figura # 2	Ubicación en Ecuador.....	58
Figura # 3	Ubicación en Sucumbíos.....	59
Figura #4	Ubicación de tratamientos y repeticiones en la parcela de biorremediación.....	70

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexos	111
Anexo A	112
Anexo B	118

INTRODUCCIÓN

La problemática ambiental, es un tema que en los últimos años ha sido preocupación del Estado y de los diferentes actores que laboran en la industria hidrocarburífica, por cuanto al uso indiscriminado y al inadecuado manejo y disposición del petróleo esto a llevado a una acumulación de la contaminación, daños al ambiente y riesgos tecnológicos (5)

Antes, esto no parecía complicado, las industrias no tenían mayor problema para deshacerse de sus residuos puesto que eran vertidos en los cauces de los ríos o dejados a la intemperie. Sin embargo cuando la velocidad de producción de residuos supera la velocidad de degradación en el ambiente, surge la contaminación, y con ello la pérdida de especies. (19)

Los daños ambientales ocasionados por la industria petrolera estatal, son causales de sanciones estipuladas en la Constitución de la República, la Ley de Gestión Ambiental, el Reglamento Sustitutivo del Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas, entre otros; que pueden ir desde multas, hasta paralización de la actividad e incluso la cárcel para los funcionarios que por acción u omisión permitieran la alteración del medio ambiente. (20)

La contaminación de suelos por hidrocarburos tiene un pronunciado efecto sobre las propiedades de los suelos con procesos de salinización, toxicidad sobre los microorganismos, mortandad de la vegetación por efectos fitotóxicos, entre otros.

La biodegradación efectuada por poblaciones naturales nativas de microorganismos, representa un mecanismo para la recuperación de suelos contaminados con petróleo. La actividad enzimática microbiana es la responsable de dicha biodegradación de contaminantes. (5)

La EPA define biorremediación como la manipulación de sistemas biológicos para efectuar cambios en el ambiente. En un ambiente con suficiente disponibilidad de oxígeno, fósforo, nitrógeno, y otros nutrientes, los contaminantes del medio son utilizados como fuente de carbono para el crecimiento y multiplicación microbiana, siendo degradados a compuestos tales como dióxido de carbono y agua o modificándolos a formas menos tóxicas. Dado que el petróleo es una mezcla compleja, su degradación es favorecida por una interacción de diversas especies microbianas. (33)

Una de las técnicas de biorremediación más difundidas es la denominada Landfarming, que consiste en tratar suelos por aireación mecánica de capas poco profundas, que casi nunca exceden los 30 cm de espesor, con esta técnica es posible conseguir resultados satisfactorios, dependiendo principalmente del tipo de suelo y contaminante, y de las características climáticas del lugar. (8)

Para lograr una efectiva degradación es necesaria la presencia de microorganismos y otros organismos en asociaciones apropiadas y en condiciones adecuadas para la actividad biológica. Trabajos realizados recomiendan mantener una microflora una relación adecuada de nutrientes, C:N:P / 100:10:2.

La optimización de procesos para remediación biológica de contaminantes en los suelos es de importancia práctica para disminuir el tiempo de remediación y economizar costos de tratamiento. (16)

En el presente trabajo se estima la biorremediación de los hidrocarburos totales (TPH) mediante la biorremediación bajo condiciones naturales (atenuación natural), activación de bacterias autóctonas, estimulación con nutrientes orgánicos (bioestimulación) y acondicionador.

Las características operativas del Campamento Guarumo (Petroproducción) localizado en el cantón Lago Agrio, el origen del suelo contaminado sus propiedades físicas, químicas, biológicas y las condiciones climáticas del medio son idóneas para llevar a cabo la biorremediación siendo el modelo mas apropiado y la menos agresiva ya que no representa un peligro biológico usando bacterias nativas de la zona, adaptada a la tecnología landfarming recomendada para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos en la que se requiere períodos cortos de tratamiento, se obtiene mayor uniformidad del tratamiento debido a la facilidad de homogenizar, proteger y mezclar continuamente el suelo (aeración).

En la presente investigación se ha presentado los siguientes objetivos:

GENERAL

- ❖ Biorremediar el suelo contaminado con hidrocarburo de la Central Hidroeléctrica del Campo Secoya por Landfarming.

ESPECÍFICOS

- ❖ Caracterizar el suelo contaminado con hidrocarburo en base al análisis de sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas para el sistema Landfarming.
- ❖ Estimular la actividad bacteriana autóctona mediante con nutrientes orgánicos y acondicionador.
- ❖ Evaluar el grado de degradación de TPH del suelo en función de la cantidad de materia orgánica y del acondicionador.

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Petróleo

La palabra *petróleo* proviene de 'petro' (piedra) y 'oleo' (aceite), o sea 'aceite de piedra'. (29) Es un líquido oleoso bituminoso de origen natural compuesto por diferentes sustancias orgánicas. Se encuentra en grandes cantidades bajo la superficie terrestre y se emplea como combustible y [materia prima](#) para la [industria química](#). (26)

Químicamente, el petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos, es decir, de compuestos ricos en carbono e hidrógeno, aunque contiene otros elementos minoritarios como azufre, oxígeno y nitrógeno, así como trazas de metales. Es compleja porque dada la capacidad del átomo de carbono de formar cuatro enlaces con otros átomos de carbono, se pueden organizar como cadenas ó como ciclos. (29)

Las cadenas se conocen como compuestos alifáticos, y consisten en sucesiones de átomos de carbono unidos entre sí por enlaces sencillos (alcanos), dobles (alquenos) o triples (alquinos) mientras que el resto de las valencias son ocupadas por hidrógenos. Los alcanos son la familia más numerosa en el petróleo crudo y se conocen como parafinas, pueden ser lineales o ramificados y su longitud varía de 1 a 40 carbonos, aunque se ha logrado detectar cadenas de 60 carbonos. Los ciclos pueden ser saturados, donde varios carbonos se unen entre sí por medio de enlaces sencillos, ó pueden ser aromáticos, donde algunos carbonos del ciclo están unidos por enlaces dobles. Los

ciclos saturados se conocen como ciclo-alcanos, ciclo-parafinas o naftenos y son un componente minoritario del petróleo crudo. Los compuestos aromáticos son derivados del benceno, un anillo de seis carbonos unidos por tres enlaces sencillos y tres enlaces dobles alternados. Los anillos pueden encontrarse fusionados entre ellos o sustituidos con cadenas alifáticas. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAP`s) ó polinucleo aromáticos comprenden del 10 al 25% del petróleo crudo y son las fracciones más pesadas. (29)

El proceso comenzó hace muchos millones de años, cuando surgieron los organismos vivos en grandes cantidades, y continúa hasta el presente. Los sedimentos se van haciendo más espesos y se hunden en el suelo bajo su propio peso. A medida que se van acumulando depósitos adicionales, la presión sobre los situados más abajo se multiplica por varios miles, y la temperatura aumenta en varios cientos de grados. El cieno y la arena se endurecen y se convierten en esquistos y arenisca; los carbonatos precipitados y los restos de caparzones se convierten en caliza, y los tejidos blandos de los organismos muertos se transforman en petróleo y gas natural. (26)

1.1.1. Problemas socio ambiental generados por la industria petrolera

En la actualidad, los distintos países dependen del petróleo y sus productos; la estructura física y la forma de vida de las aglomeraciones periféricas que rodean las grandes ciudades son posibles gracias a un suministro de petróleo relativamente abundante y barato. Sin embargo, en los últimos años ha descendido la disponibilidad mundial de esta materia, y su costo relativo ha aumentado. Es probable que, a mediados del siglo XXI, el petróleo ya no se use comercialmente de forma habitual. (34)

Mientras lleguemos a dicha situación, el petróleo sigue siendo la principal actividad económica del país y es por ello que en cada nuevo frente petrolero que se abre se forman inmediatamente conglomeraciones humanas habitacionales de precarias condiciones, violentando, generalmente las normas de seguridad de las empresas petroleras, las mismas que poco pueden hacer debido a la actitud irresponsable de algunos políticos como alcaldes de los distintos municipios, que con afanes electorales, defienden e inclusive auspician las invasiones hacia terrenos que por seguridad no deben ser habitados. (34)

No es menos cierto que todas las empresas petroleras que operan en la amazonía han generado contaminaciones del medio ambiente que han afectado a la población. Eventualmente se presentan derrames de petróleo que afectan principalmente a los cuerpos hídricos. Como si todo esto fuera poco, activistas ecológicos, llegaron con mensajes de indemnizaciones que contempla la ley ambiental, esto para el campesinado significaba una sola cosa: *las contaminaciones dan plata*, y así se ha dado inicio a una era en que la mayoría de derrames de petróleo son provocados por campesinos que cortan las tuberías que atraviesan sus fincas, con esto obtienen indemnizaciones económicas y puestos de trabajo por algunos meses mientras dure la limpieza. Petroecuador ha intentado varias veces no indemnizar cuando se trata de derrames provocados, sin embargo, debe enfrentarse a comunidades enteras, que como ya se mencionó, reciben el respaldo de autoridades seccionales, prensa y grupos ecológicos, que por desconocimiento o irracionalidad auspician, de cierta forma, que se continúe con estas acciones nefastas para el sensible ecosistema amazónico (34)

1.2. El suelo como hábitat para los microorganismos

Llamamos suelo a la parte más externa de la corteza terrestre, resultante de la meteorización de las rocas subyacentes y con unas características claramente diferenciadas de las mismas. Podemos considerar el suelo como un sistema de interacción entre tres fases bien definidas: una fase sólida, constituida por materia mineral y orgánica, una fase líquida, y una fase gaseosa o atmósfera del suelo. (9)

El tipo y composición de la materia mineral viene dado por las características de las rocas del subsuelo, así como de los procesos edáficos que hayan tenido lugar en su formación. La porción inorgánica es muy importante por su influencia en la disponibilidad de nutrientes, aireación, retención de agua, etc. La materia orgánica procede de la actividad de los distintos organismos vivos del suelo y su composición y cantidad es variable, principalmente en función del tipo de cubierta vegetal. El resto del volumen del suelo está prácticamente constituido por espacios porosos, que a su vez están ocupados por agua y los gases que constituyen la atmósfera edáfica. La porosidad (cantidad y tamaño de los poros) depende de la textura, determinada por la cantidad de arena, limo y arcilla, la estructura y el contenido en materia orgánica. Todos estos factores determinan a su vez el movimiento y capacidad de retención de agua del suelo y la composición gaseosa de su atmósfera. De forma característica la atmósfera del suelo se encuentra enriquecida en dióxido de carbono y empobrecida en oxígeno, como resultado de la respiración aeróbica de raíces de plantas, animales y microorganismos. Sin embargo, cuando se producen condiciones de anaerobiosis (por acumulación de

agua en los poros del suelo) aparecen en la atmósfera del suelo otros gases como óxido nítrico, nitrógeno gaseoso y metano, resultantes de actividad respiratoria anaeróbica bacteriana. Tanto el contenido en agua como la composición de la atmósfera del suelo son factores que fluctúan ampliamente. (10)

Este sistema complejo que constituye el suelo, característicamente heterogéneo espacial y temporalmente, alberga una gran riqueza de especies vegetales, animales y microbianas. El suelo es un ambiente muy apropiado para el desarrollo de los microorganismos tanto eucariotas (algas, hongos, protozoos) como procariotas (bacterias y arqueas). También encontramos virus y bacteriófagos. Todos estos organismos establecen relaciones entre ellos en formas muy variadas y complejas y también contribuyen a las características propias del suelo por su papel en la modificación de las fases sólida, líquida y gaseosa antes mencionadas. Los microorganismos 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. (9)

Los organismos del suelo no se distribuyen al azar sino que siguen patrones espaciales de agregación, a escalas diferentes (desde nm a km) que se superponen. Esta estructuración obedece al efecto causado por diferentes factores de control y es totalmente dinámica. Utilizando técnicas de observación de secciones ultrafinas de suelo mediante microscopía electrónica, tomografía, análisis geoestadístico y la elaboración de modelos, se ha demostrado que la distribución de las bacterias edáficas

está altamente estructurada, y que esta estructuración es importante para la funcionalidad del suelo. Las bacterias se organizan en microcolonias compuestas de pocas células que pueden pertenecer a diferentes morfotipos. Factores como la presencia de raíces, pequeños agregados, nutrientes y poros parecen gobernar la distribución de bacterias en microhábitats. (18)

La complejidad del suelo como ecosistema (nivel microscópico incluido) junto con las especiales particularidades de los microorganismos, tales como su tamaño microscópico y las dificultades para una diferenciación basada en su morfología, habían proporcionado una visión del mundo microbiano edáfico como una “caja negra” de la cual se sabía que cumplía una función aunque no se conociese su contenido. (13)

1.3. Contaminación de suelos. Implicaciones en su calidad

Se considera que cuando un suelo está contaminado se ha superado su capacidad de amortiguación para una o varias sustancias. En consecuencia, pasa de actuar como un sistema protector a ser causa de problemas para el agua, la atmósfera y/o los organismos. Al mismo tiempo se modifican sus equilibrios biogeoquímicos y aparecen cantidades anómalas de determinados componentes que causan cambios en sus propiedades físicas, químicas o biológicas. (15)

Hemos indicado hechos muy comunes en los que fenómenos de degradación derivados de la agricultura y factores ambientales, e incluso desertificación, inciden muy negativamente en la calidad de los suelos donde dichos fenómenos se producen. Sin

embargo, no son sólo los procesos anteriormente mencionados los que afectan gravemente a la calidad de los suelos; su contaminación por compuestos no deseables tiene también implicaciones graves sobre la calidad del suelo que es contaminado. Este fenómeno adquiere cada vez mayor importancia, debido a que la sostenibilidad de un recurso natural tan fundamental como el suelo, pasa sin duda por su conservación; de ahí que procesos de contaminación de suelos, deban de ser controlados, y en su caso, estudiados para poder evitarlos. (15)

Los procesos de contaminación de suelos muy estudiados han sido aquellos en los que intervienen contaminantes orgánicos como los hidrocarburos o pesticidas. En muchos casos han sido aplicadas técnicas de biorremediación para disminuir dicha contaminación, y aminorar así la incidencia del contaminante frente a la calidad del suelo contaminado. Los efectos que los contaminantes orgánicos provocan en el suelo están influidos por la propia degradación o desaparición del medio del compuesto mencionado. (31)

Es necesario considerar los efectos negativos sobre la calidad de los suelos cuando se incorporan dichos contaminantes, que serán más permanentes y perjudiciales cuanto más persistentes sean éstos. Dichos efectos pueden afectar a las comunidades de microorganismos existentes y su actividad.

Además de los procesos biológicos, otros procesos tales como adsorción o transporte que actúan en tándem determinan la persistencia de contaminantes orgánicos en los suelos, y, en definitiva, contribuyen a una mayor o menor exposición a los seres vivos.

Por lo tanto, cuanto más tiempo permanezca un contaminante en el suelo, no sólo se hacen de más patentes sus efectos sobre la calidad del mismo, sino mayor será la probabilidad ejercer efectos tóxicos sobre los organismos, y por tanto mayor será su riesgo. (31)

1.4. Microbiología de suelos

Si bien algunos microorganismos son patógenos, la mayoría participa en procesos de descomposición y mineralización de residuos vegetales y animales convirtiendo los materiales orgánicos complejos en biomasa microbiana y en moléculas simples que pueden ser utilizadas por plantas y otros organismos. Los microorganismos tienen un papel importante en la formación de una buena estructura del suelo: El mucílago producido por las bacterias y las hifas de hongos y actinomicetos, contribuyen a mantener las partículas de suelo unidas. (11)

TABLA I. Actividades desarrolladas por los microorganismos del suelo.

ACTIVIDAD	FUNCION
Disponibilidad de nutrientes	Fijación biológica de nitrógeno. Asociación con hongos formadores de microcolonias. Producción de quelatos orgánicos. Reacciones de oxido-reducción. Descomposición de residuos. Solubilización de nutrientes. Mineralización de nutrientes.
Control biológico	Control de enfermedades de planta. Control de poblaciones de nematodos, insectos y malezas.
Biodegradación de plaguicidas y contaminantes	Reducción de metales tóxicos a menos tóxicos. Utilización de plaguicidas como fuente de nutrientes.

	Inactivación de plaguicidas.
Formación de agregados	Formación de Humos. Producción de sustancias que cementan partículas. Producción de hifas que unen partículas.

Fuente: Hendrix (1990)

- **Bacterias aerobias:** Estas participan en los procesos de descomposición de residuos, formación de agregados, interacciones con plantas y otros microorganismos. Si bien la mayoría son aerobias, algunas toleran condiciones de poca disponibilidad de oxígeno, géneros comúnmente observados en suelos son *Bacillus* y *Pseudomonas*.
- **Actinomicetos:** Son microorganismos capaces de crecer en un rango de pH entre 4 y 10, la mayoría son aeróbicos, pueden crecer en suelos alcalinos o neutros y son intolerantes a condiciones de anegamiento. Existen especies capaces de crecer a altas temperaturas favoreciéndose su crecimiento en el compost. Son capaces de degradar muchas sustancias complejas incluyendo celulosa, lignina y quitina. Son responsables del "olor a tierra" y ayudan a aumentar la estructura del suelo.
- **Hongos:** Los hongos se encuentran principalmente en el suelo bien aireado. Algunos son patógenos de plantas, otros son importantes al degradar compuestos orgánicos como celulosa, lignina, pectina. Favorecen la estructura del suelo al

unir las partículas para formar agregados estables. Los hongos toleran generalmente pH ácidos. (11)

Tabla II. Valores normalmente observados en diferentes suelos y abonos orgánicos

GRUPOS FUNCIONALES	SUELO (UFC X 1000)	ABONOS ORGANICOS (UFC X 1000)
Bacterias	1000 - 100000	1000 - 1000000
Actinomicetos	100 - 10000	100 - 100000
hongos	1 - 100	10 - 1000

Fuente: Hendrix (1990)

1.4.1. Bacterias nativas

Los llamados organismos hidrocarburoclásticos son bacterias y hongos capaces fisiológica y metabólicamente de degradar petróleo. La fracción del total de organismos

que metabolizan hidrocarburos es altamente variable, 6% a 82% para hongos terrestres, 0.13% a 50% para bacterias de la tierra, y 0.003% a 100% para bacterias marinas.

En ecosistemas no contaminados, los microorganismos degradadores de hidrocarburos constituyen menos del 0.1% de la comunidad microbiana; mientras que en ecosistemas contaminados con hidrocarburos estos pueden constituir porcentajes más altos de la comunidad microbiana. Las poblaciones dominantes en estas comunidades poseen características nutricionales relacionadas al contaminante, y pueden ser también resistentes a muchas formas de estrés ambiental. (34)

Cuando la fuente de carbono es un substrato insoluble como un hidrocarburo, los microorganismos facilitan su difusión hacia la célula produciendo sustancias como carbohidratos, ácidos grasos, enzimas, biosurfactantes. Los microorganismos utilizan estos compuestos a manera de un biofilm alrededor de la molécula del hidrocarburo para posteriormente ingerirlo o romperlo en compuestos simples de carbono y oxígeno. Estos microorganismos usan la energía liberada para manejar los procesos termodinámicamente no espontáneos como la síntesis de componentes celulares. (34)

1.5. Mecanismos del suelo en la retención de metales

Las cantidades de metales disponibles están reguladas, en parte, por el intercambio iónico. Existen, además ciertos procesos de adsorción que incluyen uniones covalentes con ciertos grupos funcionales de las superficies de las arcillas. Gran número de investigadores afirma, por otra parte, que el intercambio de cationes y las quelaciones

de la materia orgánica, son los principales procesos que facilitan la disponibilidad de los metales. Esta disponibilidad facilita o dificulta el mecanismo de porción cuando sube el pH del suelo. (22)

1.5.1. Intervención de la materia orgánica

La Materia orgánica puede ser considerada como el factor más importante que influye en la sorción y en la formación de complejos metálicos, basados en la capacidad de quelación de los componentes orgánicos.

Se ha comprobado que los ácidos hùmicos y fùlvicos tienen constantes de gran estabilidad para los metales, siendo los mayores responsables de la inmovilización de estos por la materia orgánica, aunque no por ello dejan de formar ciertos compuestos metálicos solubles, sobre todo en disoluciones diluidas. (22)

Los complejos más estables son los derivados de los metales de transición, o los que les siguen inmediatamente después en la clasificación periódica de los elementos

La gran complejidad de la fracción orgánica del suelo, dificulta mucho el estudio de la formación de complejos metálicos y los ataques biológicos que sufren estos compuestos. (22)

Además de las sustancias húmicas, existen, otros productos capaces de formar complejos metálicos. Estos productos son de bajo peso molecular y pueden complejar o

solubilizar los metales. Se presentan en cantidades variables, y su composición es diversa; suelen preceder de exudados o de secreciones de las raíces vegetales, o de los propios microorganismos del suelo.

La quelación, proceso por el cual los átomos del metal en disolución son captados por moléculas en forma de anillo, pueden ser considerados como una variante de la formación de complejos. Los quelatos pueden formar complejos de gran estabilidad en función, entre otras cosas, del número y tamaño de los anillos (a mayor número y menor número mas estabilidad). (22)

1.5.2. Fertilización orgánica

La adición de la materia orgánica supone un esfuerzo importante en los suelos degradados ya que modifica, mejorándolas en parte, sus características físicas y químicas. La materia orgánica tiene casi siempre un elevado contenido en nutrientes, mejora la capacidad de retención del agua y favorece la germinación.

La existencia de metales pesados en el suelo, la solubilidad de metales, o las altas concentraciones salinas, producen efectos tóxicos y a veces letales en muchas especies vegetales. La adición de materia orgánica es un buen tratamiento para estos problemas, ya que ésta frecuentemente se queda con los metales, eliminando así la toxicidad hasta su mineralización. Esto permite el restablecimiento de una cubierta vegetal, que a largo plazo crea una capa de materia orgánica amortiguadora. (22)

1.6. Transformación biológica de compuestos orgánicos

Los compuestos biodegradables se encuentran inicialmente vinculados a enzimas extracelulares y son transportados a través de la membrana celular. Entonces, se produce una serie de reacciones de transformación en las cuales se separan los electrones del compuesto y se oxida la estructura de carbono. La energía desprendida en las reacciones se emplea para la síntesis de nuevo material celular, para la reparación del material dañado, el transporte de compuestos al interior de la célula y, en algunos casos, para el movimiento. Una vez que los contaminantes orgánicos han sido convertidos en CO_2 y H_2O , se dice que se ha producido la mineralización. Nunca se produce la mineralización completa, debido a que una parte del material orgánico se transforma en células y una parte importante de la masa celular es, en efecto, no biodegradable. Sin embargo, la transformación de material tóxico y peligroso en una combinación de CO_2 , H_2O y nuevas células elimina la mayor parte de los problemas que requieren recuperación. (14)

1.6.1. Metabolismo de los contaminantes

El metabolismo de los contaminantes orgánicos puede ser ampliamente diferenciado por la disponibilidad de los organismos a utilizarlos para sus procesos catabólicos. Los contaminantes pueden actuar como:

- **Sustratos primarios:** si el compuesto actúa como primer dador de electrones, proporcionando a las bacterias energía suficiente para el crecimiento celular.
- **Sustratos secundarios:** cuando la oxidación del contaminante proporciona energía a las células del microorganismo, pero está presente a concentraciones

que no son suficientes para satisfacer todas las necesidades energéticas del microorganismo.

- **Cometabolismo:** cuando un compuesto es metabolizado fortuitamente al mismo tiempo que una célula está obteniendo energía de otro dador primario de electrones. Aquí se incluiría la dehalorespiración, proceso mediante el cual ciertos compuestos orgánicos clorados actúan como aceptores finales de electrones en condiciones anaerobias. (32)

1.7. Fundamentos microbiológicos

1.7.1. Biomasa microbiana

La determinación de la biomasa microbiana ha cobrado importancia en los últimos al papel de los microorganismos en el ciclaje e inmovilización de nutrientes. Esta fracción contiene 1 a 13% del C total del suelo y hasta el 5% del N total por lo que puede generar nutrientes en cantidades suficientes para llenar las demandas de las plantas. (23)

1.7.2. Actividad microbiana

Debido al papel de los microorganismos en la descomposición de residuos, una medida de actividad biológica puede ser un indicador valioso del efecto del manejo del sistema

sobre la población microbiana del suelo. Algunas de las técnicas utilizadas reflejan la actividad de individuos o grupos de organismos específicos, mientras que otras se refieren a la actividad total de la biota del suelo. Entre las primeras técnicas se encuentran la medición de la actividad de diferentes enzimas en el suelo. La actividad total de la población microbiana del suelo puede determinarse utilizando la técnica de respiración. (12)

La actividad degradativa de poblaciones naturales de microorganismos es uno de los principales mecanismos por el cual se elimina el petróleo y otros hidrocarburos contaminantes del ambiente. (29)

Como los organismos individualmente pueden metabolizar un limitado rango de hidrocarburos, se asocian en poblaciones mixtas para adquirir una amplia y completa capacidad enzimática suficiente para degradar complejas mezclas de hidrocarburos como el petróleo crudo en el suelo. (31)

Los importantes grupos bacterianos implicados en la biodegradación de hidrocarburos y otros contaminantes están compilados en la base de datos de cepas biodegradativas donde se destacan los géneros: *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Desulfitobacterium*, *Flavobacteriu*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*.

Las *Pseudomonas* son las bacterias más eficientes en la degradación de compuestos tóxicos. La capacidad de estas bacterias para degradar a los hidrocarburos depende del

tiempo de contacto con el compuesto, las condiciones ambientales en las que se desarrollen y su versatilidad fisiológica. (33)

Además, aunque no han sido caracterizados en su totalidad, muchos de estos microorganismos poseen actividades que permiten la oxidación algunas fracciones del petróleo. Esta oxidación permite la conversión a bióxido de carbono y agua. (30)

1.7.3. Factores influyentes sobre la comunidad microbiana

La concentración y composición de la comunidad microbiana y la tasa de transformación de contaminantes está influenciada por diversos factores:

- **Necesidad de nutrientes:** El metabolismo microbiano está orientado a la reproducción de los organismos y éstos requieren que los constituyentes químicos se encuentren disponibles para su asimilación y sinterización. Los nutrientes principalmente requeridos son el fósforo y el nitrógeno. Por lo general suele haber en el suelo una concentración de nutrientes suficiente, sin embargo, si estos no se encontrasen en el rango normal se puede adicionar mayor cantidad al medio. El rango normal de C:N:P depende del sistema de tratamiento a emplear, siendo de modo habitual 100:10:1.

- **pH del suelo:** afecta significativamente en la actividad microbiana. El crecimiento de la mayor parte de los microorganismos es máximo dentro de un intervalo de pH situado entre 6 y 8. Así mismo el pH también afecta directamente en la solubilidad del fósforo y en el transporte de metales pesados en el suelo. La acidificación o la reducción del pH en el suelo se puede realizar adicionando azufre o compuestos del azufre.
- **Temperatura:** generalmente las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos, entre 15 y 45 °C (condiciones mesófilas), decreciendo la biodegradación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40 °C e inhibiéndose a inferiores a 0 °C.
- **Humedad:** los microorganismos requieren unas condiciones mínimas de humedad para su crecimiento. El agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células. Un exceso de humedad inhibirá el crecimiento bacteriano al reducir la concentración de oxígeno en el suelo. El rango varía en función de la técnica.
- **Estructura química del hidrocarburo:** la inherente biodegradabilidad de un hidrocarburo depende, en gran medida, de su estructura molecular. Siendo los

parámetros que más van a afectar la halogenación, la existencia de ramificaciones, la baja solubilidad en el agua y la diferente carga atómica. (17)

Entonces, la biodegradación, en nuestro caso, es un proceso de transferencia de electrón. La energía requerida para la síntesis y el mantenimiento de la célula se obtiene con la oxidación de los compuestos del hidrocarburo. Los electrones se quitan de los substratos orgánicos (donantes de electrón) para capturar la energía disponible con el proceso de la oxidación. Los aceptadores terminales de electrón son necesarios para los electrones que se mueven a través de electrones de transferencia o de cadenas respiratorias. (27)

1.7.4. Metabolismo de los microorganismos

Metabolismo es el término utilizado para referirse a más de un centenar de transformaciones químicas individuales que toman parte en una célula. El objetivo final de estas reacciones o transformaciones es la producción de nuevas células. El metabolismo se divide en dos procesos generales:

- **Anabolismo o Biosíntesis:** proceso que requiere energía mediante el cual los microorganismos construyen material celular.
- **Catabolismo:** proceso de producción de energía mediante el cual los microorganismos oxidan compuestos.

Ambos procesos se organizan en una serie de pequeños pasos y están estrechamente relacionados. El carbono es el nutriente más requerido (ocupa el 50% del peso seco de la célula), de aquí que los microorganismos necesiten de una fuente de carbono para el metabolismo, y como el metabolismo involucra una transferencia de energía, los microorganismos también necesitarán de una fuente de energía, para llevar a cabo las reacciones metabólicas. Los microorganismos se clasifican según la fuente de carbono, la fuente de energía y tipo de aceptores finales de electrones que utilizan en los procesos metabólicos. (32)

Los microorganismos obtienen energía para sobrevivir mediante el proceso de catabolismo.

La extracción de energía de compuestos químicos orgánicos durante el catabolismo es el resultado de los procesos de oxidación. Cuando un compuesto químico es oxidado, éste pierde electrones. Por ello, a dichos compuestos químicos se los denomina dadores primarios de electrones. Los electrones perdidos durante la oxidación están asociados con la reducción de los aceptores de electrones. Las reacciones de oxidación-reducción que ocurren durante el catabolismo finalizan en la reducción del aceptor final de electrones. Los aceptores finales de electrones más comunes en las aguas subterráneas son O^2 , NO^3^- , Fe^{3+} , SO_4^{2-} , CO_2 . Cuando el oxígeno es el aceptor final de electrones, el catabolismo se clasifica como aeróbico y en las demás condiciones el catabolismo es anaerobio. La mayoría de bacterias son capaces de utilizar solo un aceptor final de electrones, a excepción de las denominadas facultativas aerobias que pueden utilizar nitratos como aceptores finales de electrones en ausencia de oxígeno. (32)

El tipo de microorganismos implicados en la atenuación natural de los contaminantes son básicamente las bacterias. La biodegradación de los contaminantes vendrá marcada por el tipo de bacteria presente en el medio: biodegradación aerobia, anaerobia o vía cometabolismo. Las bacterias se agrupan en tres categorías dependiendo del tipo de aceptor final de electrones (TEA: aceptor final de electrones) que utilizan):

- ***Bacterias aerobias***: solo pueden utilizar como TEA el oxígeno. En ausencia de oxígeno no son capaces de degradar compuestos.
- ***Bacterias facultativas (aerobias / anaerobias)***: utilizan como TEA el oxígeno y en ausencia de éste pueden utilizar nitratos, óxidos de manganeso, u óxidos de hierro.
- ***Bacterias anaerobias***: no pueden utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones, es tóxico para ellas. Pueden utilizar cualquier otro aceptor de electrones, generalmente sulfatos y dióxido de carbono. (4)

El potencial de biodegradación de los contaminantes dependerá de la disponibilidad de los dadores primarios de electrones y de los aceptores finales de electrones, la presencia de ambos es de vital importancia para la supervivencia de los microorganismos que obtienen energía de la biodegradación de dichos compuestos. (4)

1.7.5. Modelización del crecimiento bacteriano y del consumo de sustrato limitante

El crecimiento bacteriano se fundamenta en el proceso de fisión binaria, una célula se divide en dos que son idénticas a la célula madre. La tasa de crecimiento bacteriano está influenciada por un número de parámetros tales como: tipo de cepas, disponibilidad de sustrato, temperatura y otras condiciones medioambientales. El crecimiento bacteriano bajo condiciones favorables se puede modelizar en 4 fases:

1. **Fase de retraso:** no existe crecimiento.
2. **Fase de crecimiento microbiano exponencial:** debido a la rápida fisión binaria de las células.
3. **Fase estacionaria:** el número de bacterias se vuelve constante. La causa de esta etapa es el agotamiento en el medio de los recursos esenciales para su crecimiento. La disponibilidad limitante del sustrato controla el proceso de crecimiento microbiano.
4. **Fase de decadencia:** el medio está agotado de constituyentes necesarios para el sustento de los microorganismos. Las tasas de mortalidad de las células exceden cualquier posible recrecimiento. (6)

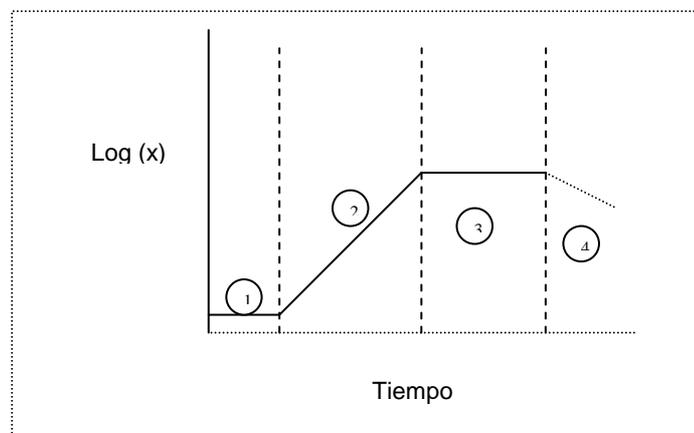


Figura N° 1. Fases de Crecimiento Bacteriano. (6)

1.8. Biodegradación

Es el resultado de los procesos de digestión, asimilación y metabolización de un compuesto orgánico llevado a cabo por bacterias, hongos, protozoos y otros organismos. (2)

Los microorganismos del terreno transforman tanto compuestos orgánicos como inorgánicos. Los procesos de biodegradación incluyen reacciones de oxidación-reducción, procesos de adsorción e intercambio de iones y reacciones de quelación de formación de complejos, que dan lugar a la fijación de los metales. (14)

Muchos estudios han demostrado que la biodegradación por los microbios indígenas puede contribuir perceptiblemente a la destrucción de compuestos orgánicos

La biodegradación es un proceso natural ventajoso no sólo por permitir la eliminación de compuestos nocivos impidiendo su concentración, sino que además es indispensable

para el reciclaje de los elementos en la biosfera, permitiendo la restitución de elementos esenciales en la formación y crecimiento de los organismos (carbohidratos, lípidos, proteínas). La descomposición puede llevarse a cabo en presencia de oxígeno (aeróbica) o en su ausencia (anaeróbica). La primera es más completa y libera energía, dióxido de carbono y agua, es la de mayor rendimiento energético y se describe así:

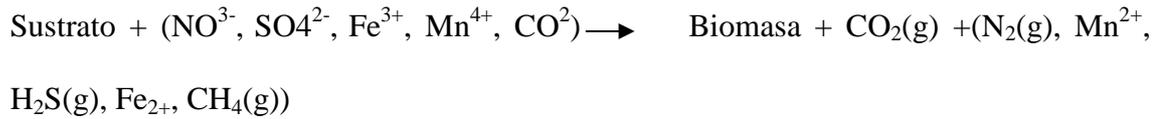
Degradación aerobia:



La biodegradación aerobia es la reacción más fácil para la aceptación de electrón terminal y esta usada para la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo. Este proceso de degradación ocurre en presencia de microbios aerobios. Los últimos productos de la mineralización de compuestos orgánicos son dióxido de carbono, agua y masa de la célula. Los organismos anaerobios facultativos pueden utilizar el oxígeno cuando es presente o puede cambiar en aceptadores alternativos del electrón.

Los procesos anaeróbicos son oxidaciones incompletas y liberan menor energía y se describen así:

Degradación anaerobia:



Otros aceptadores de electrón como los iones nitrato, sulfato, férrico, manganeso, y así sucesivamente, serán utilizados cuando el oxígeno no está disponible. Es obligar los organismos anaerobios a ser dominante en ausencia del oxígeno. La degradación bajo condiciones anaerobias puede ser relativamente lenta. Los productos metabólicos de la biodegradación anaerobia incluyen los ácidos orgánicos simples, el CO_2 , el H_2O , el CH_4 , el H_2 , el N_2 , y la masa de la célula. (32)

1.9. Biorremediación

El término biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, etc.) para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos. Esta estrategia biológica depende de las actividades catabólicas de los organismos, y por consiguiente de la utilización de los contaminantes como fuente de alimento y energía. Para que esto ocurra, es necesario favorecer las condiciones para el crecimiento y la biodegradación. (25)

La meta final de la biorremediación, es la mineralización del contaminante. Es decir, la completa degradación de una molécula orgánica hasta compuestos inorgánicos (CO_2 , agua y formas inorgánicas de N, P y S) y componentes celulares. (1)

Su aceptación como una estrategia de limpieza viable, en muchos casos, depende de sus costos. Sin embargo, muchas de las estrategias de biorremediación son competitivas en términos de costos y del impacto sobre la matriz contaminada. (21)

Entre las ventajas que las tecnologías de biorremediación para el tratamiento de sitios contaminados presentan sobre los métodos fisicoquímicos tradicionales, se encuentran:

- Disminución en costos de operación
- Los contaminantes son destruidos o transformados; y normalmente no se requiere o se necesita un mínimo de tratamientos adicionales.

Aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, los procesos de biorremediación se han usado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados con TPH, solventes, explosivos, clorofenoles, pesticidas, conservadores de madera e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's). (21)

1.9.1. ¿por qué no se hace biorremediación en Ecuador?

Las primeras investigaciones sobre biorremediación en nuestro país fueron en los laboratorios de biología de la Universidad Católica de Quito en la década de los ochenta. Allí, Petroecuador con un 50% de fondos provenientes de una ONG europea, hizo las primeras contrataciones de este tipo de servicios, que por cierto, son sumamente caros. Y este factor ha sido el principal o talvez único impedimento para que esta técnica de remediación se propague a todo nivel.

Técnicos de Petroecuador (Petroproducción específicamente) han realizado varios experimentos de campo sobre esta técnica y la han aplicado en derrames pequeños con volúmenes inferiores a cinco barriles de petróleo. Para aplicarlo en derrames superiores a cinco barriles el tratamiento debe ser plenamente documentado y esta investigación podrá cubrir la mencionada deficiencia para contar con la aprobación de la DINAPA y con ella Petroecuador pueda remediar suelos por gestión directa ahorrando ingentes recursos al fisco. (33)

1.9.2. Tecnologías de biorremediación de suelos

La biorremediación de suelos puede llevarse a cabo *in situ*, o bien, el material puede ser excavado y tratado *ex situ*. La principal ventaja de los tratamientos *in situ* es que permiten tratar el suelo sin necesidad de excavar ni transportar, dando como resultado una disminución en costos. Sin embargo, este tipo de tratamientos generalmente requiere de periodos de tratamiento largos y es menos seguro en cuanto a la uniformidad del tratamiento debido a la heterogeneidad propia del suelo. Las tecnologías de biorremediación *in situ*, incluyen el bioventeo, la bioaumentación, la bioestimulación, la biolabranza, la atenuación natural y la fitorremediación. (25)

La principal ventaja de las tecnologías *ex situ*, es que generalmente requieren de periodos más cortos que los anteriores, son más seguros en cuanto a la uniformidad del tratamiento, ya que el sistema puede homogeneizarse y mezclarse continuamente. Otra ventaja, es que los productos permanecen dentro de la unidad de tratamiento hasta la

obtención de productos no peligrosos. Sin embargo, los tratamientos *ex situ* requieren de la excavación del suelo. Las tecnologías de biorremediación *ex situ*, incluyen procesos de composteo (biopilas) y el uso de biorreactores (de lodos y en fase sólida). (25)

1.9.3. Pruebas de factibilidad

Antes de empezar un proyecto de biorremediación es preferible realizar un estudio de factibilidad para caracterizar las propiedades específicas del sitio.

Estas pruebas ayudan a optimizar las condiciones para el manejo técnico del proyecto, y también son importantes para evitar “sorpresas” que puedan complicar el proyecto, haciéndolo más tardado y costoso. Hay dos aspectos de dicho estudio:

1. La caracterización de las propiedades físico-químicas del material (suelo, lodo, sedimento) a tratar y del contaminante.
2. La determinación del potencial de los microorganismos del sitio para descomponer los hidrocarburos.

La caracterización físico-química consiste en la determinación de varias propiedades importantes para la biorremediación, tales como el pH, la conductividad, textura, carbono orgánico, nutrientes inorgánicos (como N, P, K, Ca, Mg), tipo y concentración de hidrocarburo, así como la toxicidad del material. (31)

Además de estas pruebas, frecuentemente se determina la actividad microbiana del material en su estado no alterado. Esto se hace por pruebas como las de respiración microbiana, o por pruebas enzimáticas, como las de catalasa, o deshidrogenada. (31)

Tabla III. Requerimientos y factores importantes para la biorremediación.

Factor	Observaciones
Tipo de hidrocarburos	Mejor con combustibles, lubricantes, petróleo crudo. Más difícil con aceite hidráulico, hidrocarburos muy viscosos, o hidrocarburos contaminados con otros compuestos (como metales, plaguicidas, etc.).
Tipo de material	Mejor con materiales de textura mediana o franca, con alto contenido de materia orgánica. Más difícil con materiales muy arcillosos. pH.
pH	En zonas pantanosas, o en algunos suelos ácidos de sabana (como los ferrosoles, acrisoles y luvisoles) se puede manejar un pH de 4 a 6 sin mucho problema si se utilizan bacterias nativas. En la mayoría de suelos un pH de 6 a 8 es más adecuado
Salinidad	Puede variar mucho. Si está en una zona de manglares debe de usar bacterias nativas, las cuales son adaptadas a las condiciones. El suelo contaminado de un marisma puede tener demasiadas sales para usar la biorremediación
Aireación	Es importante mantener condiciones aerobias debido a que las tasas de biodegradación en condiciones anóxicas son aprox. 50 a 100 veces menores. Esto se logra utilizando un buen sistema de drenaje, y aireando el suelo frecuentemente (mínimo de cada tres días) con maquinaria (como un tractor).
Lixiviados	Es importante tener un buen sistema para coleccionar los lixiviados de una celda de "land farming". Estos se pueden usar para rehumedecer la celda, así conservando los nutrientes y bacterias en ella.
Techo	Es muy recomendable usar un techo sobre celdas de "landfarming" en climas tropicales debido a las lluvias fuertes que pueden inundar una celda
Nutrientes	Se necesita mantener las concentraciones de nutrientes inorgánicos en el rango de aprox. 100 ppm N, >10 ppm P, y >1 ppm K. El empleo de fertilizantes agrícolas comunes frecuentemente cumple con esta necesidad.
Temperatura	La biorremediación funciona en un rango de temperatura de aprox. 5 a 40 °C, pero es mejor en una temperatura de aprox. 30 a 35 grados, idóneo para climas tropicales.
Bacterias nativas	Es probablemente tan bien o mejor usar las bacterias nativas del sitio debido a que éstas ya están adaptadas a las condiciones particulares del sitio, y su desarrollo cuesta mucho menos que la compra de fórmulas comerciales de bacterias.

Acondicionadores	Para mejorar el drenaje y mantenimiento de humedad en la celda se puede agregar otros materiales como arena, paja, cáscara de nuez, etc.
Humedad	Es necesario mantener la humedad de una celda de "landfarming" en el rango de aprox. 50 a 75 % de la capacidad de campo del material a tratar (ya con su acondicionamiento).

Fuente: Woodward y Day (1996)

1.9.4. Limitaciones de la biorremediación

A este punto es importante mencionar que la biorremediación tiene sus limitaciones y no se debe esperar una panacea. Aunque los hidrocarburos en el intervalo de gasolina y diesel (n-alcanos) se biodegradan fácilmente, es relativamente difícil la restauración de sitios altamente contaminados por hidrocarburos poliaromáticos (HAP`s) a través de la biorremediación. (3)

Esto se debe principalmente a la viscosidad alta y solubilidad baja de los HAP`s, las cuales limitan el área superficial disponible para el ataque de las enzimas bacterianas. Otros factores limitativos pueden ser las concentraciones tóxicas de los hidrocarburos de bajo peso molecular, y las concentraciones altas de metales (que no son biodegradables).

Se debe de considerar la biorremediación como una de las alternativas de tecnologías para el saneamiento de sitios contaminados por hidrocarburos. Se tiene que evaluar su efectividad en términos de costo-beneficio y compararla con otras tecnologías. De

cualquier modo, usualmente se compensan estas limitaciones por el ahorro en los costos, en comparación con otras tecnologías de restauración. La biorremediación es típicamente 30 a 40 % del costo del tratamiento químico, la incineración o el relleno industrial. (15)

1.10. Tecnología Landfarming

Landfarming es una tecnología de biorremediación a gran escala que se aplica sobre zonas superficiales del suelo o en celdas de biotratamiento requiere excavación para ubicar suelos, sedimentos o lodos contaminados. (7).

El medio contaminado es aplicado en lechos nivelados y periódicamente deben ser removidos o arados para permitir la aeración del desecho. Las condiciones del suelo son a menudo controladas para utilizar el índice de degradación del contaminante.

El Landfarming es un proceso donde se utilizan las bacterias nativas para degradar los componentes de petróleo que ocurren en el suelo, la bacteria degrada el componente orgánico, produciendo dióxido de carbono y agua. Para el desarrollo eficiente de este proceso es necesario proveer las condiciones óptimas para el crecimiento de la población bacteriana. Esta metodología de tratamiento está especialmente recomendada para productos semivolátiles a pesados y en predios donde existen suelos arcillosos (en el caso de no existir suelos arcillosos, se dispondrá de una impermeabilización artificial para evitar toda posibilidad de percolación de lixiviados). (33)

El Landfarming utiliza la superficie del suelo para descomponer los residuos aeróbicamente. Como la superficie del suelo se aísla de las aguas subterráneas por capas impermeables, es un método seguro en cuanto a las probabilidades de contaminar las capas freáticas.

El manejo de un Landfarming implica la investigación preliminar del residuo, el control del sitio de degradación, su actividad biológica, el clima, actividad de laboratorio, etc.

(33)

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Descripción del área de trabajo

2.1.1. Localización geográfica

El área de trabajo se localiza en un terreno posterior de la Bodega Central del Campamento Guarumo de Petroproducción; el mismo fue previamente compactado. El Campamento Guarumo se halla a dos kilómetros al este de la población de Pacayacu, Parroquia Pacayacu, Cantón Lago Agrio, Provincia de Sucumbios, en el Km.44 de la vía Nueva Loja-Tarapoa.

2.1.2. Datos físicos

La región del oriente más próximo a la cordillera toma las características subtropicales con temperaturas que oscilan alrededor de los 20° C; pero la zona propiamente selvática se distingue por un clima de tipo ecuatorial con humedad muy elevada y temperaturas que revelan insignificantes oscilaciones estacionales, según lo prueba el dato que se registre una temperatura media 24 °C en el mes de julio y 25 °C en el mes de enero. El sector experimenta la influencia alterna de las masas de aire cálido y húmedo procedentes del Atlántico, por lo tanto muy lluvioso. Se reciben precipitaciones a lo largo de todo el año con medias que pueden alcanzar con facilidad hasta los 4.500 milímetros.

El Clima es cálido-húmedo la temperatura varía entre 22 y 26 °C; es la región más húmeda del país. Tiene dominantes precipitaciones (más de 3.000 mm. Anuales.) Los flancos de los Andes forman una zona densamente nublada, debido a que allí se condensan grandes masas de vapor proveniente del Atlántico y de la selva amazónica.

Las características del área donde se desarrolla el estudio son las siguientes:

- 1.- La Temperatura ambiente media registrada durante todo el año es de 26.7 °C
- 2.- La Humedad relativa en la zona es de 79 %
- 3.- La Velocidad del viento es de 2.1 m/s
- 4.- La Nubosidad promedio alcanza unas 7/8

En su mayor parte, el suelo es arcilloso (gleysol), con deficiente drenaje, geográficamente se encuentra en las coordenadas 325417 E y 9994338 N.

2.1.3. Ubicación geográfica

Figura 2 Ubicación en Ecuador



Figura 3 Ubicación en Sucumbíos



Lugar: Campamento Guarumo (Petroproducción)

Parroquia: Pacayacu

Cantón: Lago Agrio

Provincia: de Sucumbíos

2.2. Materiales experimentales

2.2.1. Suelo contaminado

El suelo contaminado con hidrocarburo procedente de la Estación Hidroeléctrica Del Campamento Secoya utilizado para la biorremediación presenta una naturaleza arcillosa, fácilmente manejable y no compacta, siendo de esta manera óptimo para dar un tratamiento mediante Landfarming ya que si fuera dispuesto sin ningún tratamiento causaría impactos negativos al ecosistema.

2.2.2. Acondicionador

Como acondicionador se utilizó aserrín proveniente de los aserraderos de la parroquia Pacayacu, el mismo que por provenir de madera fácilmente degradable de nombre sangre de gallina (*Otoba parvifolia*).

2.2.3. Nutrientes

Los nutrientes utilizados fueron los residuos orgánicos vegetales procedentes de la cocina del campamento Guarumo aportando nutrientes y humedad que facilita el desarrollo de las bacterias autóctonas del suelo.

2.2.4. Bioceldas

Las bioceldas son unidades experimentales donde se deposita el suelo contaminado con el acondicionador y la materia orgánica en distintas proporciones para que se realice el proceso de biorremediación. La dimensión de cada biocelda fue 3m de largo por 3,5 de ancho.

2.3. Material de campo

- Palas
- Azadón
- Machete
- Rastrillo
- Carretilla
- Camión de Carga
- Botas de caucho
- Poncho de aguas

- Geomembrana HDPE 1mm, 126m²
- Fundas Ziploc de polietileno
- Guantes
- Cámara fotográfica digital

2.4. Equipos

Los equipos y reactivos corresponden al laboratorio de Protección Ambiental LABPAM de Petroproducción Lago Agrio.

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica
- Cromatógrafo de gases
- Detector de Fluorescencia (HPLC)
- Espectrofotómetro HACH
- pH metro
- Autoclave
- Balanza analítica
- Estufa
- Mufla
- Refrigeradora
- Computadora
- GPS 12, S/N36806311,GARMIN

2.5. Métodos

2.5.1. Muestreo

2.5.1.1. Recolección del material de base (suelo contaminado)

El material de base fue colectado en el mes de mayo del año 2007, de un derrame ocurrido en un sumidero de la planta de generación eléctrica de la Compañía Ecuapet que proporcionaba energía a Petroproducción, para la obtención de los valores iniciales se tomaron 2 submuestras a diferentes profundidades, fueron homogenizadas para preparar una muestra compuesta, la muestra fue colocada en una funda ziploc herméticamente sellada preservada a una temperatura de 4 °C hasta su análisis.

2.5.1.2. Recolección del material en tratamiento (bioceldas)

Para cada una de las bioceldas existentes se realizó un muestreo al azar de tres submuestras de igual volumen, las submuestras fueron homogenizadas manualmente para preparar una muestra compuesta, a la cual se le realizó divisiones por cuarteo.

2.6. Métodos analíticos

Para el seguimiento de los diferentes tratamientos se aplicaron los métodos analíticos que se detallan a continuación:

2.6.1. Determinación analítica de hidrocarburos totales (TPH)

Metodología equipo usado

Extracción con freón y determinación por espectrofotometría infrarrojo.

Referencia

EPA 413.1; 1664; Publicación n° ECY 97-602

2.6.2. Determinación de metales pesados: cadmio

Metodología equipo usado

Digestión ácida, filtración y determinación por espectroscopia de absorción atómica.

Referencia

SW-846-3050B/7130 Cd

2.6.3. Determinación de metales pesados: níquel

Metodología equipo usado

Digestión ácida, filtración y determinación por espectroscopia de absorción atómica.

Referencia

SW-846-3050B/7520 Ni

2.6.4. Determinación de metales pesados: plomo

Metodología equipo usado

Digestión ácida, filtración y determinación por espectroscopia de absorción atómica.

Referencia

SW-846-3050B/7420 Pb

2.6.5. Determinación de temperatura

Metodología equipo usado

Determinación directa con termómetro de mercurio, graduado de 0.1°C.

Referencia

APHA/AWWA/WEF 2550

2.6.6. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL HIDRÓGENO (pH)

Metodología equipo usado

Determinación potenciométrica con electrodo calibrado en dos puntos.

Referencia

APHA/WWA/WEF Standard Method No 4500-H⁺

2.6.7. Determinación de la humedad (%H)

Determinación gravimétrica por la diferencia de peso entre las muestras húmedas y secas. El secado de las muestras se realizó en una estufa a 60 °C, durante 24 horas.

2.7. Métodos microbiológicos

2.7.1. Aerobios mesófilos

Disolución del suelo en agua peptonada, siembra en medio de cultivo e incubación a 44.5°C

Referencia

INEN 15295, 1990 ISO 4833, 2003

2.8. Normas utilizadas

La norma utilizada en este estudio es el Registro Oficial No 265 – D. E. 1215 expedida el 13 de Febrero del 2001, es, esta una norma de cumplimiento obligatorio para todas las Operaciones Hidrocarburíferas que se desarrollan en el Ecuador.

Proporciona los límites mínimos y máximos permisibles de los contaminantes inherentes que producen estas operaciones y además, también proporciona una guía de los métodos de análisis estándar que se utilizan en la cuantificación de los mismos.

En el R.O. No. 265 emitido el 13 de Febrero del 2003 por la DINAPA se manifiesta:

Los límites permisibles a aplicarse en un proyecto determinado depende del uso posterior a darse al suelo remediado, el cual constará en el Respectivo Programa o Proyecto de Remediación aprobado por la Subsecretaria de Protección Ambiental.

TABLA IV. Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera.

Parámetro	Expresado en	Unidad	Uso agrícola	Uso Industrial	Ecosistemas Sensibles
Hidrocarburos totales	TPH	mg/Kg	<2500	<4000	<1000
Cadmio	Cd	mg/Kg	<2	<10	<1
Níquel	Ni	mg/Kg	<50	<100	<40
Plomo	Pb	mg/Kg	<100	<500	<80

Fuente: R.O. No 265 – Tabla No 6 – Pag. 3

CAPÍTULO III

CAPITULO III

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Metodología

3.1.1. Construcción de las bioceldas (semi – piloto)

Para el tratamiento del suelo contaminado con hidrocarburo se utilizó la técnica landfarming para lo cual se construyó un cubeto de 18m x 7m, con una inclinación de 5° para evitar el aglutinamiento del agua lluvia, previamente impermeabilizado con geomembrana delimitada por un muro de tierra de 0.40m de altura y rodeada por un canal perimetral 0.5 m que dirige las aguas lluvias y probables lixiviados de hidrocarburos a un sumidero también impermeabilizado y provisto de un sistema de tubo en cuello de ganso con el fin de capturar los lixiviados, minimiza el riesgo de contaminación por lixiviación.

3.1.2. Preparación de los tratamientos

Se trabajó con tres tratamientos y tres réplicas de cada uno, más tres celdas control con suelo sin tratar que corresponde al blanco, con el fin de evaluar el efecto de cada tratamiento, dando un total de 12 unidades experimentales

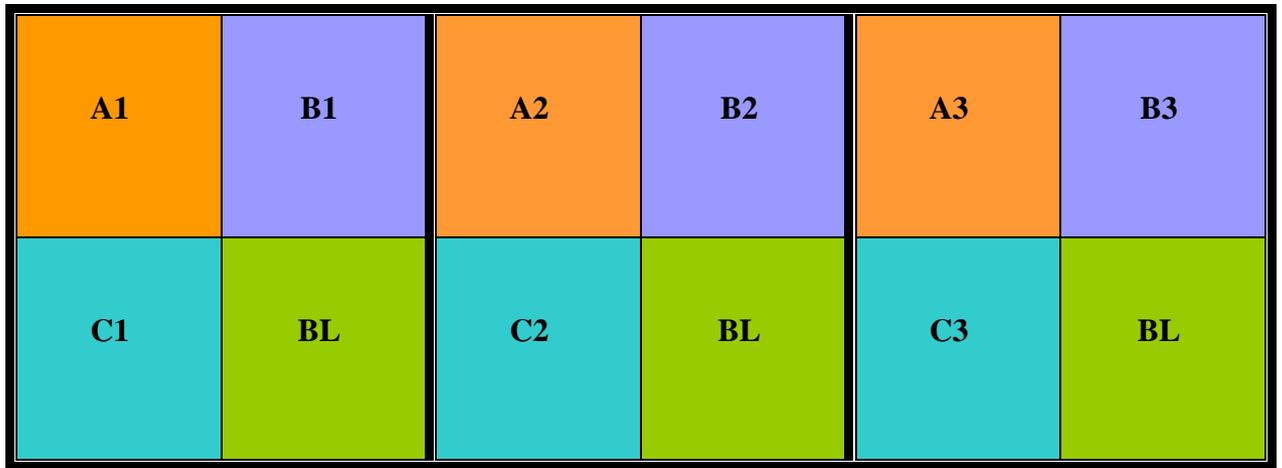
El área de tratamiento (cubeto) fue dividida en 12 celdas, las cuales contienen partes iguales de suelo contaminado (149.66 Kg).

El suelo contaminado con hidrocarburo de 1632.66 Kg (100%) se mezcló con suelo no contaminado en una proporción del 10%, fue homogenizado manualmente con la ayuda de palas y repartido en partes iguales en las diferentes celdas, finalmente se añadió nutrientes y acondicionador de acuerdo a los tratamientos. El suelo no contaminado corresponde al que se encuentra ubicado dentro de los límites del área de tratamiento.

Los tratamientos aplicados fueron: tratamiento T-A (25% materia orgánica + 75% aserrín), tratamiento T-B (75% materia orgánica + 25% aserrín), tratamiento T-C (50% materia orgánica + 50% aserrín).

Las unidades experimentales (bioceldas) se mantuvieron a temperatura ambiente, en días de lluvias abundantes esta se cubrió con plástico, para ayudar al proceso de biodegradación se dio aeración manual tres veces por semana para lograr una mayor soltura de la tierra, a los 100 días de iniciado el tratamiento se adicionó los porcentajes correspondientes de cada tratamiento, nutrientes (materia orgánica) y acondicionador (aserrín), con la finalidad de asegurar la actividad y diversidad de la población microbiana, la biorremediación se llevo a cabo durante un periodo de siete meses (206 días).

Figura 4: Ubicación de tratamientos y repeticiones en la parcela de Biorremediación



3.2. Pruebas analíticas

3.2.1. Determinación del potencial hidrógeno

Objetivo

- Establecer el procedimiento que asegure la determinación correcta del potencial hidrógeno de la muestra analizada, con el uso correcto del pH – metro.
- Establecer un instructivo para la calibración de pH – metro usado en el análisis en el laboratorio.

Equipo

- pH - metro

Materiales

- Vasos de precipitación
- Espátula

Preparación de la muestra

- Se pesan 20 g de muestra de suelo contaminado con hidrocarburo.
- Se coloca en un vaso de precipitación que contenga 100ml de agua desionizada.
- Agitar por 10 minutos

Procedimiento:

- Lavar el potenciómetro.
- Enjuagar el electrodo de vidrio con agua destilada y secar.
- Calibrar el aparato con dos soluciones tampón, siguiendo las instrucciones del equipo.
- Enjuagar nuevamente el electrodo con agua destilada.
- Sumergir el electrodo en la muestra y hacer la lectura de pH de acuerdo con las instrucciones del equipo.
- Enjuagar el electrodo con agua destilada y dejarlo en un recipiente con agua destilada.

Almacenamiento y conservación del pH

Una vez realizadas las mediciones, se realizará una limpieza general del equipo utilizado y se almacenará adecuadamente en su correspondiente contenedor, anotando que el electrodo debe estar siempre colocado en un recipiente con agua destilada, para garantizar el estado de conservación del mismo.

3.2.2. Determinación de hidrocarburos totales

Objetivo

Establecer el procedimiento para la determinación de TPH de la muestra analizada.

Equipos

- Estufa
- Balanza analítica
- Espectrofotómetro IR
- Agitador mecánico
- Ultrasonido

Reactivos

- 4 STD (10-clorobenceno; 15-iso octano; 15 n-hexano)
- Sulfato de Sodio anhidro 1,5 g
- Tetracloruro o freón 10 ml
- Silicagel 0,6 g

Materiales

- Espátula

- Tubos de ensayo con tapa rosca
- Peras
- Pipetas
- Papel filtro

Preparación de la muestra

- Poner la muestra en papel aluminio y colocarla en la estufa durante 10 horas.
Triturar la muestra.
- Calibrar espectrofotómetro IR (calentar a 30 a 60 min). Con 4 STD sellados (10-clorobenceno; 15-iso octano; 15 n-hexadecano 0-10-53-235 ppm).
- Preparar 4 tubos de ensayo con tapa rosca.
- Al tubo N° 1 colocar 1,5 g de NaSO₄ anhidro previamente secado 150 °C x 12 h.
Adicionar 2g de muestra seca pulverizada. Adicionar 10 ml de tetracloruro o freón.
- Se tapa y agita x 1 min en agitador mecánico
- Acción en ultrasonido x 10 min.
- Agitar x 30 seg en agitador mecánico.
- Acción del ultrasonido x 5 min.
- Agitar del agitador mecánico x 10 seg.
- Dejar en reposo x 30 min.
- Transferir la fase líquida

- Al tubo N° 2 con 0,6 g silicagel 60 – 200
- Agitar x 30 seg agitador mecánico.
- Tratamiento en ultrasonido por 15 min.

3.2.3. Determinación de aerobios mesófilos

Objetivo

Establecer el procedimiento para la determinación de los microorganismos.

Método

El conteo de poblaciones microbianas por dilución en placa es un método simple y rápido para la cuenta viable de células microbianas en el suelo. Sin embargo, la cuenta obtenida es generalmente 10 a 100 veces menos que aquella determinada por cuenta directa por microscopía.

Las razones para esta discrepancia incluyen la exclusión de la cuenta no viable directamente en el suelo y la inhabilidad para proveer apropiados nutrientes en el medio de crecimiento, para obtener la cuenta total en placa.

Equipos

- Campana de flujo laminar o área estéril
- Balanza.
- Incubadora.

Materiales

- Tubos de vidrio

- Pipetas estériles.
- Espátulas.
- Placas para recuento de aerobios
- Varilla de vidrio.
- Muestra de suelo.
- Papel aluminio estéril.

Reactivos

- Peptona 9 ml
- Etanol (CH₃-CH₂-OH)
- Agua destilada

Preparación de la muestra

- Pesar 1 gramo del suelo contaminado con hidrocarburo.
- Colocar en un tubo 9 ml de agua peptonada.
- Dejar por una hora, para que se activen las bacterias.
- Coger del tubo 1 ml y colocar en otro tubo que contenga 9 ml de agua peptonada (factor 1/10).
- Tomar 0.1 ml de la dilución seleccionada y colocarla en el centro de la superficie del medio de cultivo seleccionado para el crecimiento.
- Realizar esto por triplicado y con tres diluciones próximas (ej. 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵) para asegurar la cuenta.

- Extender la alícuota en la superficie de la placa con una varilla de vidrio previamente esterilizada (inmersa en alcohol y pasándola por la flama del mechero permitiendo su enfriamiento). Asegurar una distribución homogénea por toda la superficie del medio.
- Incubar las placas de forma invertida a 30°C en ausencia de luz.
- Después de un periodo de incubación (de 3 a 7 días, dependiendo del tipo de microorganismo), contar el número de colonias y reportar unidades formadoras de colonias (UFC)/ g de suelo.

Cálculos:

Contar sólo aquellas cajas (diluciones) que contengan de 30 a 300 colonias.

Con la siguiente ecuación calcular las UFC/g s.

$$\text{UFC/g s.} = (\text{NC} * 1/\text{FD} * 1/\text{V}) / (\text{P} * \text{FH}).$$

Donde:

UFC/ g s. = unidades formadoras de colonias / g de suelo.

NC= número de colonias en una caja.

FD = factor de dilución que corresponde a la dilución.

V= volumen inoculado en la caja.

P = peso de la muestra húmeda.

FH = factor de corrección de humedad.

3.2.4. Determinación de Cadmio, Níquel y Plomo

Objetivo

Determinar el procedimiento para la determinación de los metales pesados Cd, Ni y Pb.

Equipo

- Espectroscopia de absorción atómica.

Materiales

- Espátula
- Pipetas
- Tubos de digestión

Reactivos

- Ácido nítrico 1:1 10 ml
- Ácido nítrico concentrado 5 ml
- Peróxido 2 ml
- Agua destilada 1 ml

Procedimiento

- Pesar 5 g de suelo y adicionarle 10ml de HNO₃ 1:1, digestar.
- Enfriar, añadir 5 ml de HNO₃ concentrado, digestar.
- Enfriar y añadir 2ml de H₂O₂ y 1ml de agua destilada. Digestar por dos horas.

- Filtrar, aforar a 100 ml.

3.3. Diseño experimental

3.3.1. Características del diseño experimental

3.3.1.1. Tipo de investigación

- Por el tipo de datos a analizar: Cuantitativa
- Por las condiciones de estudio: De campo
- Por la utilización del conocimiento: Aplicada
- Por la rigurosidad del método empleado: Es un diseño bloques balanceados.

3.3.2. Metodología

Es un diseño experimental de bloques balanceados por que nos permite realizar varias repeticiones para cada tratamiento y luego balancear sacando un promedio de los tratamientos.

3.3.3. Variables de control

- Temperatura
- Humedad
- Aerobios mesófilos
- pH

3.3.4. Plan de tabulación

❖ **Parámetros de estudio:**

- Hidrocarburos totales de petróleo (TPH)
- Metales pesados

3.3.5. Tratamientos

Tabla V. Código, tratamientos y repeticiones

Código	Tratamientos	Repeticiones
A	T1	1,2,3
B	T2	1,2,3
C	T3	1,2,3
BL	BL	1,2,3

CAPÍTULO IV

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización del suelo contaminado

En la Figura N° 6 contiene los resultados de los ensayos realizado al material contaminado con crudo.

La evaluación de las características físicas destaca el contenido de humedad de campo expresado en 55% y un pH de 7.7 que lo sitúa como un material con excelentes propiedades para el trabajo de los microorganismos nativos.

La evaluación química del suelo contaminado demuestra que se encuentra hidrocarburos que teóricamente son degradables.

Según la caracterización microbiológica, la presencia de microorganismos, indica la capacidad de aumentar los recuentos microbianos cuando se incorporo el suelo natural demostrándose claros indicios de tratabilidad con métodos biológicos.

Las características adecuadas del sitio, suelo natural, y suelo contaminado para efectuar el tratamiento indican que se puede pensar en un proceso de tratamiento en terreno natural en tecnología Landfarming según COOKSON, J. (7).

Tabla VI. Variables físicas, químicas y biológicas del suelo contaminado

INDICADORES	VARIABLES		
	FÍSICAS	QUÍMICAS	BIOLÓGICAS
Textura	arcilloso		
Humedad	55 %		
pH	7,7 H ⁺		
TPH (base seca)		32.144 mg/kg	
Cd		0,27 mg/kg	
Ni		5,46 mg/kg	
Pb		6,12 mg/kg	
Densidad Microbiana			1,54E+07 UFC/g

4.2. Pruebas de biorremediación

En las siguientes secciones se presentan los resultados obtenidos durante 206 días de tratamiento en el suelo contaminado por hidrocarburos

4.2.1. Humedad

Al inicio del tratamiento, la humedad en las bioceldas fue ajustada a valores entre 50 y 75%. Los niveles de humedad para todas las bioceldas, se mantuvieron en los niveles aceptables y recomendados para la técnica Landfarming, durante todo el tiempo del estudio: humedad superior a 50%.

4.2.2. pH

Al iniciar el tratamiento en todas las bioceldas el pH fue cercano a 7,8. Los valores de pH se mantuvieron entre 6,5 y 7,3 hasta los 206 días del tratamiento.

4.2.3. Biorremediación de hidrocarburos totales

Cuadro # 1. Concentraciones de TPH (mg/Kg) del tratamiento A

<i>T-A</i> <i>(25% materia orgánica + 75% aserrín)</i>	
<i>Período (días)</i>	<i>TPH (mg/Kg)</i>
0	32.144
20	30.910
44	29.257
64	25.557
90	24.798
120	23.706
150	23.119
180	21.389
206	20.572

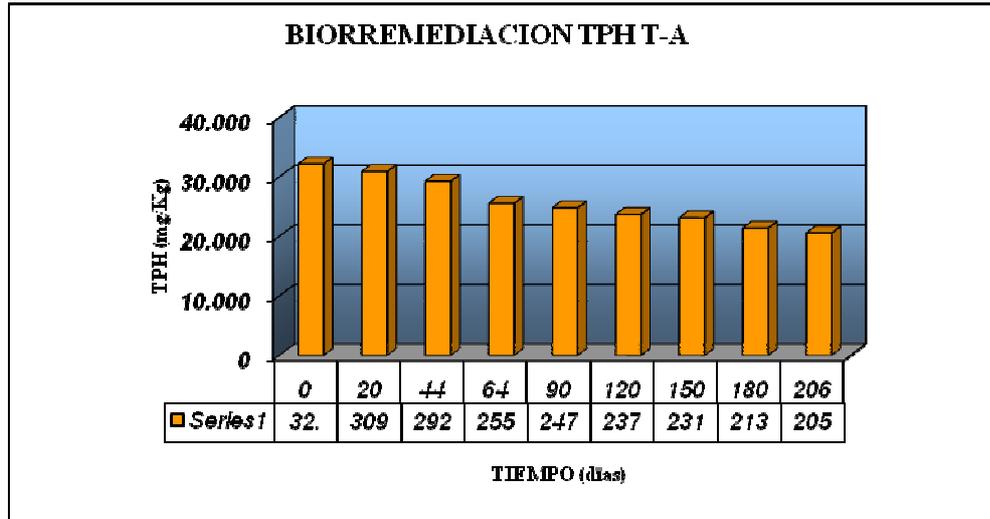


Grafico # 1 Biodegradación de TPH del T-A

En este gráfico se puede observar claramente que la biodegradación de los TPH llego a 20.572 mg/Kg, siendo relativamente lenta con diferencia a los tratamientos T-B, T-C debido a la escasa cantidad de materia orgánica que no apporto los nutrientes necesarios para la población microbiana.

De acuerdo al análisis estadístico obtenemos como resultado que este es el tratamiento menos efectivo. Así se lo comprueba en el Anexo B2

Cuadro # 2. Concentraciones de TPH (mg/Kg) del tratamiento B

<i>T-B</i> <i>(75% materia orgánica + 25% aserrín)</i>	
<i>Período (días)</i>	<i>TPH (mg/Kg)</i>
<i>0</i>	<i>32.144</i>
<i>20</i>	<i>29.755</i>
<i>44</i>	<i>27.131</i>
<i>64</i>	<i>17.234</i>
<i>90</i>	<i>16.124</i>
<i>120</i>	<i>12.139</i>
<i>150</i>	<i>10.522</i>
<i>180</i>	<i>9.782</i>
<i>206</i>	<i>9.004</i>

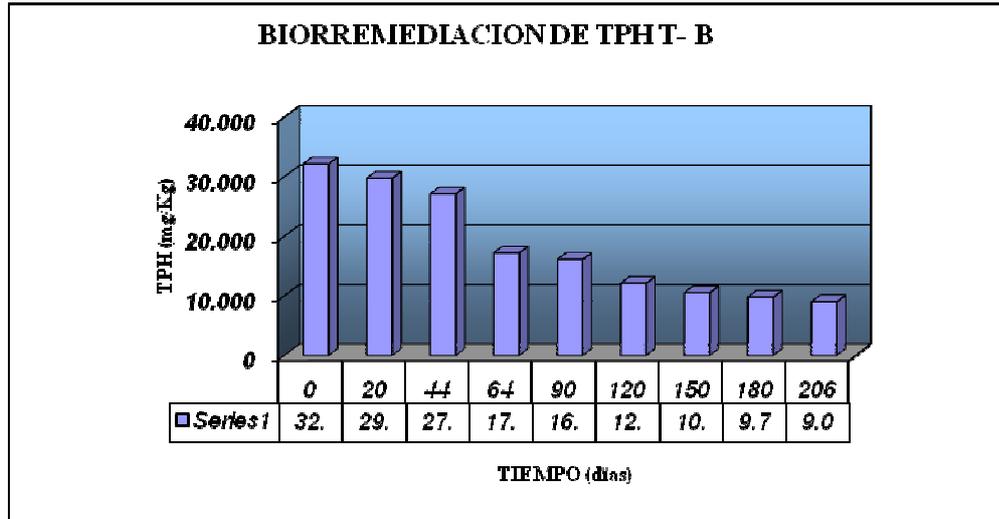


Gráfico # 2 Biodegradación de TPH del T-B

El gráfico 2 revela la biodegradación de los TPH siendo mayor durante el período de los días 44 al 64 y del 90 al 120, por el mayor porcentaje de materia orgánica correspondiente a este tratamiento, luego la degradación continuó pero de una manera más lenta debido al agotamiento de nutrientes. Dado los resultados es el mejor tratamiento obteniéndose la más alta remoción de TPH llegando a un nivel de 9.004 mg/Kg. Lo que indica que la adición de nutrientes estimuló positivamente la actividad degradativa de los microorganismos del suelo según MAROTO, A. (17).

Después de realizar el análisis estadístico este tratamiento es el que arrojó mejores resultados durante el tiempo que duro este proceso, como se indica en el Anexo B2

Cuadro # 3. Concentraciones de TPH (mg/Kg) del tratamiento C

<i>T-C</i> <i>(50% materia orgánica + 50% aserrín)</i>	
<i>Período (días)</i>	<i>TPH (mg/Kg)</i>
<i>0</i>	<i>32.144</i>
<i>20</i>	<i>30.567</i>
<i>44</i>	<i>28.160</i>
<i>64</i>	<i>21.545</i>
<i>90</i>	<i>19.228</i>
<i>120</i>	<i>18.507</i>
<i>150</i>	<i>17.871</i>
<i>180</i>	<i>16.359</i>
<i>206</i>	<i>15.179</i>

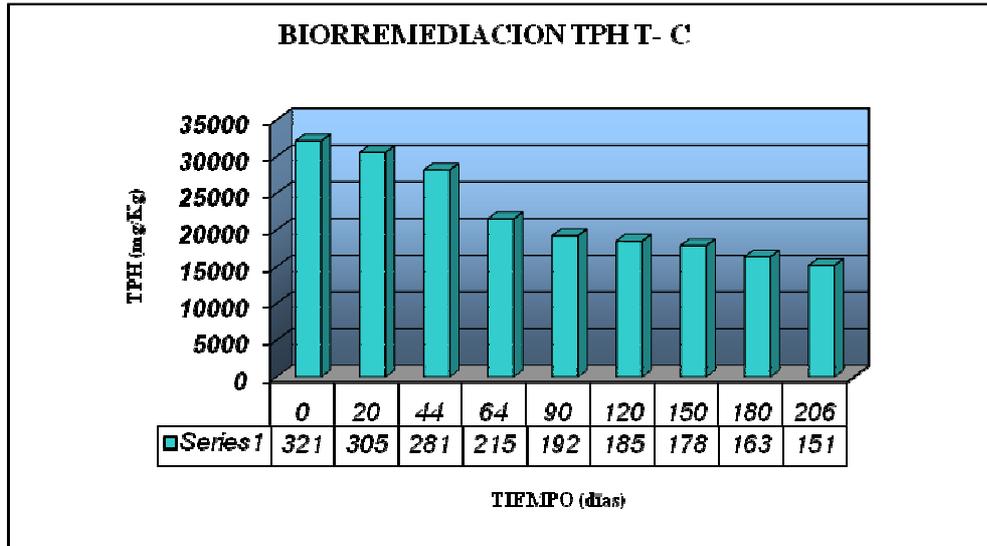


Gráfico # 3 Biodegradación de TPH del T-C

El gráfico 3 nos indica que la biodegradación de los TPH en este tratamiento llego a 15179 mg/Kg, menor en relación al T-B, pero mayor con relación al T-A.

En el análisis estadístico este tratamiento presenta un rendimiento medio entre el T-A el T-B según se indica en el Anexo B2

Cuadro # 4. Concentraciones de TPH (mg/Kg) del Blanco

<i>T-BL</i> <i>Suelo Contaminado</i>	
<i>Período (días)</i>	<i>TPH (mg/Kg)</i>
<i>0</i>	<i>32.144</i>
<i>20</i>	<i>31.741</i>
<i>44</i>	<i>31.247</i>
<i>64</i>	<i>30.756</i>
<i>90</i>	<i>30.354</i>
<i>120</i>	<i>29.942</i>
<i>150</i>	<i>29.544</i>
<i>180</i>	<i>29.162</i>
<i>206</i>	<i>28.930</i>

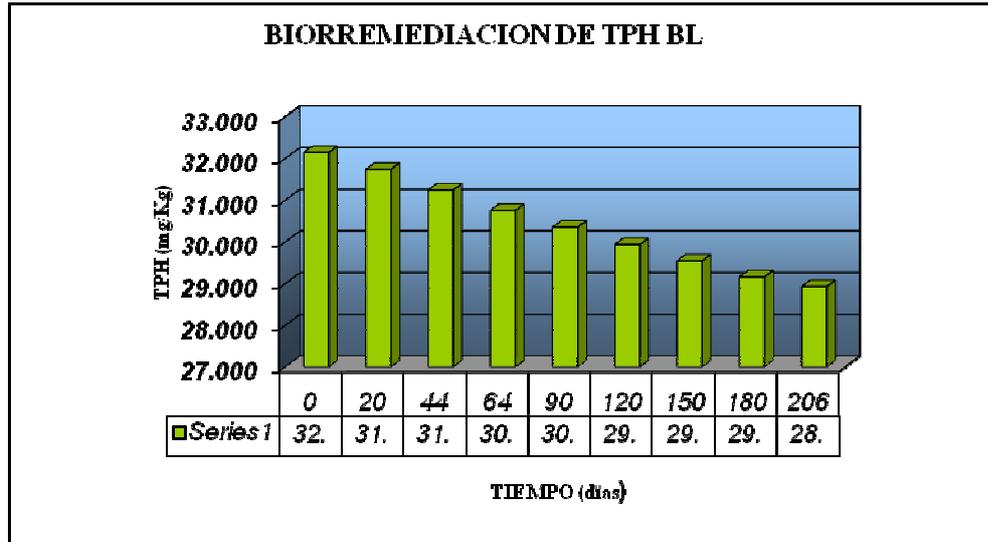


Gráfico # 4 Biodegradación de TPH del BL

El gráfico 4 nos muestra la atenuación natural del suelo a tratar obteniéndose una remoción de TPH hasta llegar a 28930 mg/Kg, producto de la actividad de los microorganismos nativos favorecidos solo por las condiciones climáticas del lugar y el viento.

En el análisis estadístico se demuestra que la atenuación natural es relativamente lenta con respecto a los T-A, T-B, T-C., como se indica en el anexo B2.

4.3. Eficiencia de la biorremediación de los Hidrocarburos Totales

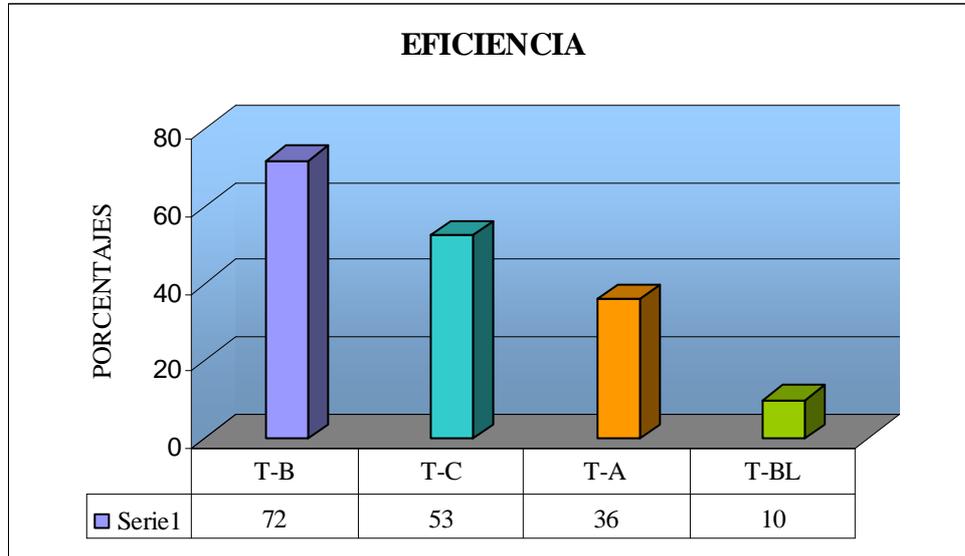


Gráfico # 5 Eficiencia de los tratamientos respecto a los TPH

La mejor eficiencia se obtuvo en el T-B con 72% seguido del T-C con 53%, el T-A con 36% y finalmente el blanco (atenuación natural) con 10%.

4.4. Eficiencia de los tratamientos respecto al Cadmio

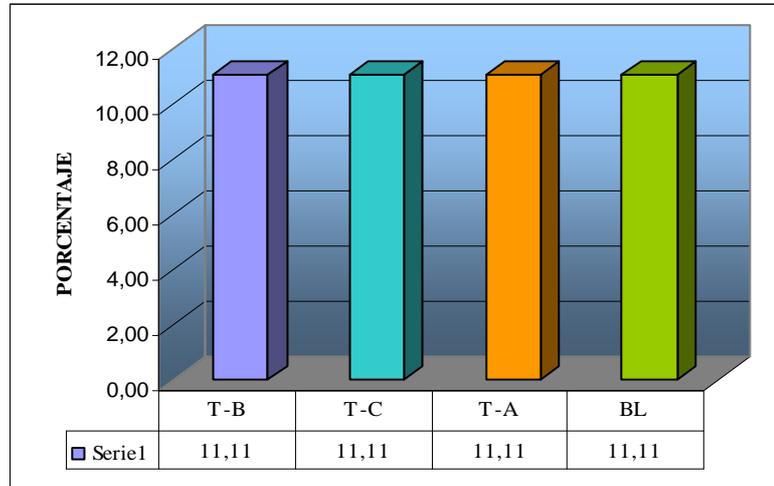


Gráfico # 6 Eficiencia de los tratamientos respecto al Cadmio

La eficiencia del cadmio en todos los tratamientos tiene el mismo valor a causa de las bajas concentraciones presentadas desde el principio del proceso estudiado ya que el equipo no detecta concentraciones menores a 0,24 mg/Kg.

Debido a que la eficiencia de todos los tratamientos para este metal son similares no se realizó análisis estadístico.

4.5. Eficiencia de los tratamientos respecto al Níquel

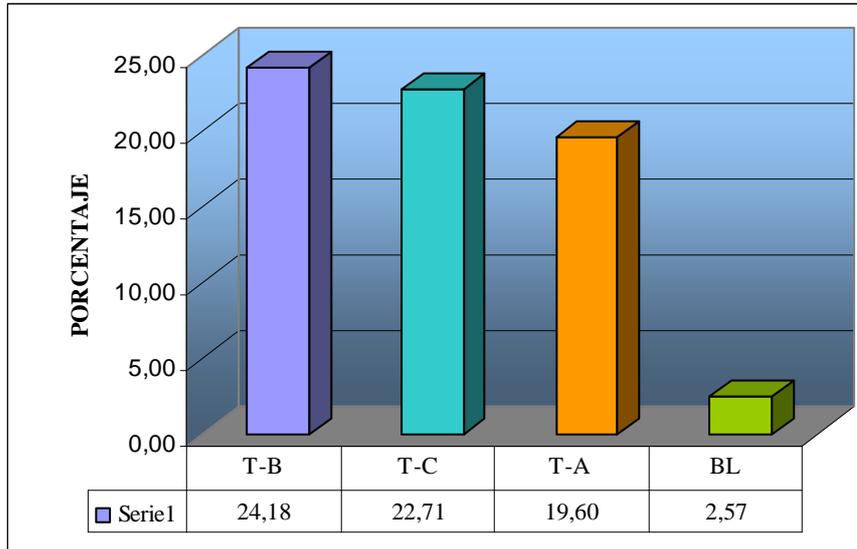


Gráfico # 7 Eficiencia de los tratamientos respecto al Níquel

La eficiencia del níquel en el T-B arroja mejores resultados alcanzando un 24,18% de remoción, el T-C con una eficiencia del 22,71% siendo el segundo mejor tratamiento, el T-A con una eficiencia de 19,60% y finalmente el blanco (atenuación natural) con un porcentaje del 2,57%.

Las eficiencias aquí presentadas se comprueban con el análisis estadístico realizado para este metal como se muestra en el Anexo B3

4.6. Eficiencia de los tratamientos respecto al Plomo

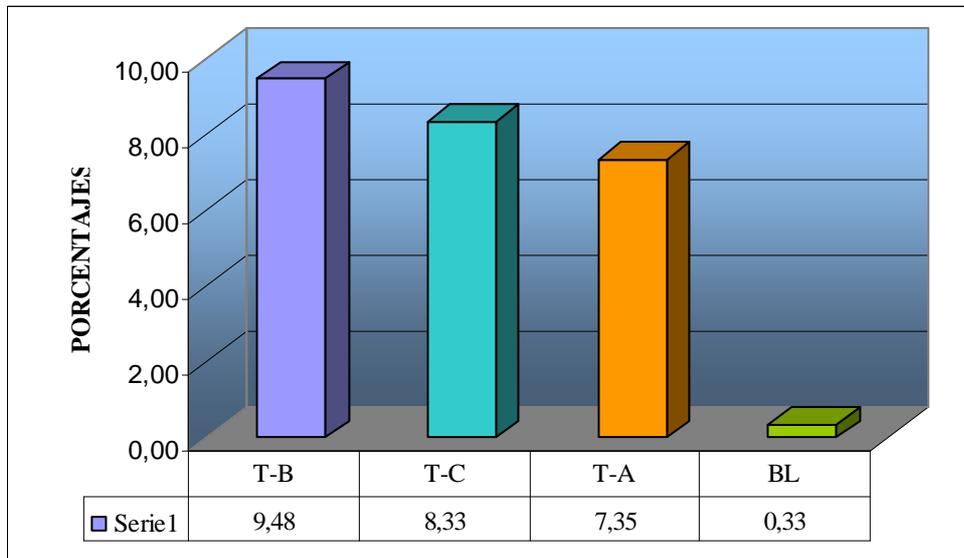


Gráfico #8 Eficiencia de los tratamientos respecto al Plomo

La eficiencia del plomo en el T-B presentó una eficiencia del 9,48%, el T-C con una eficiencia del 8,33%, el T-A con una eficiencia de 7,35% y el blanco (atenuación natural) con un porcentaje del 0,33%.

Las eficiencias aquí presentadas se comprueban con el análisis estadístico realizado para este metal como se muestra en el Anexo B4

4.7. Proyección de la biorremediación de TPH

Cuadro # 5. Proyección de la biorremediación del T-A

	Inicial	Final	Proyección							
DIAS	0	206	252	287	323	359	394	429	465	501
T - A	32.144	20.572	17.987	16.021	13.999	11.977	10.011	8.045	6.022	4.000

Cuadro # 6. Proyección de la biorremediación del T-B

	Inicial	Final	Proyección							
DIAS	0	206	215	224	233	241	250	268	277	279
T - B	32.144	9.004	7.993	6.982	5.917	5.072	4.061	2.039	1.028	804

Cuadro # 7. Proyección de la biorremediación del T-C

	Inicial	Final	Proyección							
DIAS	0	206	232	257	281	305	329	354	378	380
T - C	32.144	15.179	13.037	10.978	9.002	7.025	5.049	2.990	1.014	849

Cuadro # 8. Proyección de la biorremediación del BL

	Inicial	Final	Proyección							
DIAS	0	206	305	378	354	429	501	650	842	1227
BL	32.144	28.930	27.385	26.246	26.620	25.405	24.327	22.002	19.007	13.000

Para el T-A se estima que se alcanzará los límites permisibles exigidos en la ley para suelo agrícola (4000 mg/Kg TPH) al cabo de 501 días de iniciado el tratamiento. En el caso del T-B se alcanza este objetivo trascurridos 205 días, para el T-C en cambio se necesitarían 335 días.

Los suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, originados por derrames de la Central Hidroeléctrica Secoya mediante la Técnica de bioestimulación por LandFarming logra disminuir la concentración de TPH en el tratamiento B un 72%, en el tratamiento A un 42% y en el tratamiento C un 56%. *Con este análisis se acepta la hipótesis planteada en la investigación.*

CAPÍTULO V

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

1. El suelo contaminado de la Central Hidroeléctrica Secoya, de acuerdo al análisis físico químico presentó concentraciones que no cumplen con los parámetros permisibles para uso agrícola establecidos por RAOHE en lo que se refiere a concentraciones de TPH (32.144 mg/Kg), los metales pesados no presentaron concentraciones fuera de los parámetros establecidos.
2. Se obtuvo 12 bioceldas empleando suelo contaminado con hidrocarburos, aserrín como acondicionador y materia orgánica como fuente de nutrientes en distintas concentraciones, la humedad se mantuvo entre el rango adecuado 50% a 75% y las condiciones del lugar favorecieron para mantener estable el proceso transformándose así la técnica Landfarming en una alternativa altamente efectiva para descontaminación del suelo en la región oriental.
3. La adición de la materia orgánica (desechos vegetales de la cocina del Campamento Guarumo) favoreció a la estimulación de la población nativa presente en el suelo siendo un factor importante para la biorremediación de este, ya que en base a los resultados se aprecia que partimos de $1,54E+07$ UFC/g (caracterización inicial) y que durante los 206 días de estudio se da un aumento

considerable en el número de microorganismos degradadores de petróleo el cual llega a $2,77E+08$ UFC/g T-B.

4. El mejor resultado obtenido estadísticamente y por su eficiencia en la evaluación de los tratamientos realizados es el T-B con una eficiencia en los TPH (72%), Ni (24.18%), Pb (9,48%), Cd (11,11%), con relación a los T-A, T-C y al blanco (atenuación natural) durante un período de 206 días lo que indica que la materia orgánica ayuda al aporte de nutrientes para acelerar biodegradación de los hidrocarburos, cabe destacar que el Cd no presento ninguna variación considerable en su concentración en todos los tratamiento durante el proceso de biorremediación.

5. La atenuación natural es un proceso que requiere un mayor tiempo para recuperar el suelo, por lo que no es una técnica viable en este aspecto, en este estudio se obtuvo niveles bajos de eficiencia en los TPH (10%), Cd (11%), Ni (2,57%) y Pb (0,33%).

5.2. Recomendaciones

1. Se recomienda la biorremediación mediante bioestimulación por ser un método eficiente para la biodegradación de TPH en suelos contaminados con hidrocarburo, además de la posibilidad del empleo de desechos orgánicos vegetales y lignocelulósicos lo cual implica una opción económica y factible para las condiciones del país.
2. Se recomienda el uso de la técnica Landfarming para la biorremediación de grandes cantidades de suelo contaminado ya que su implementación es relativamente sencilla, además de la facilidad con la que se da manteniendo al tratamiento.
3. Para obtener óptimos resultados se recomienda utilizar mayor cantidad de materia orgánica y menor cantidad de acondicionador como se demostró en este estudio, el tiempo de recuperación del suelo varía de acuerdo a la cantidad de este y a la concentración del contaminante.

CAPÍTULO VI

RESUMEN

Existe contaminación de suelo por la manipulación inadecuada del petróleo. Para dar solución a este problema, existen métodos de tratamiento para su recuperación, como es la técnica landfarming. Donde la presente investigación tiene como objetivo biorremediar suelo contaminado con hidrocarburo de la Central Hidroeléctrica del Campo Secoya por landfarming de la empresa Petroproducción localizada en la provincia de Sucumbios.

Para alcanzar el objetivo planteado se realizó, 4 tratamientos con suelo contaminado, los tres primeros (TA, TB, TC) fueron tratados con nutrientes orgánicos (residuos orgánicos vegetales) y acondicionador (aserrín) y el cuarto T fue tratado como control biótico (atenuación natural). El TA se realizó con (25% MO + 75% AS), TB (75% MO + 25% AS), TC (50% MO + 50% AS) para incrementar la actividad microbiana, el suelo contaminado fue distribuido en partes iguales (100%) en los sistemas de biorremediación (bioceldas).

Como resultados se obtuvo una reducción de TPH en un 72% del TB, 53% del TC y un 36% del TA en comparación con el control biótico en el cual se obtuvieron porcentajes de remoción de 10%. Los metales pesados presentaron niveles inferiores a los establecidos por la Regulación Nacional para suelos agrícolas antes y durante el tratamiento. El mejor tratamiento como muestran los resultados es el TB obteniéndose la más alta remoción de hidrocarburo de 72% en 206 días, alcanzándose el objetivo planteado. Se recomienda la biorremediación mediante la bioestimulación ya que es un método eficiente para la biodegradación de TPH en suelos contaminados, además de la posibilidad del empleo de desechos orgánicos vegetales y lignocelulósicos lo cual implica una opción económica y factible para las condiciones del país.

SUMMARY

There is soil pollution because of the inadequate oil handling. To give a solution to this problem, there are treatment methods for its recovery such as the landfarming technique which means that present investigation deals with the bioremediation of the soil polluted with hydrocarbon from the Central Hidroeléctrica del Campamento Secoya with landfarming by the Petroproducción enterprise located in the Sucumbios province. To attain the objective 4 treatments with polluted soil were carried out. The first three (TA, TB, TC) were treated with organic nutrients (vegetal organic residues) and a conditioner (sandust) and the fourth.

It was treated as a biological control (natural attenuation). The TA was carried out with (25% MO + 75% AS), TB (75% MO + 25% AS), TC (50% MO + 50% AS) To increase the microbial activity, the polluted soil was distributed into equal parts (100%) in the bioremediation systems (biocells). The results were that there was a reduction of TPH by a 72% of the TB, 53% of the TC and a 36% of the TA as compared to the biotic control in which removal percentages of 10% were obtained, The heavy metals showed lower levels than the established ones by the National Regulation for farming soils before and during treatment. The best treatment, showed by result was the TB, with the highest hydrocarbon removal, 72% in 206 days. Thus the objective was attained. Bioremediation is recommended through biostimulation, since it is an efficient method for the biodegradation of the TPH in polluted soils. There is also the possibility of using vegetal and lignocellulosic organic wastes which implies an economic and feasible option for the country conditions

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1). ALEXANDER, M. Biodegradation And Bioremediation. 2a.ed. San Diego: Academic Press, 1994. pp. 302.
- (2). ARONSON, D. Anaerobic Biodegradation of Organic Chemicals in Groundwater. 3ra.ed. New York: Mc Graw Hill, 1997. pp. 252.
- (3). ATLAS, R. Biodegradation of Hydrocarbons in the Environment. 2a.ed. New York: Plenum Press, 1991. pp. 211-222.
- (4). AZADPOUR, A. Microbial Processes Affecting Monitored Natural Attenuation of Contaminants in the Subsurface. 2a.ed. Cincinnati: Prentice Hall, 1999. pp. 547.
- (5). BARTHA. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. 3ra.ed. Madrid: Pearson Education. 2002. pp. 255-261.
- (6). BENDIENT, P., RIFAI, H. and NEWELL, C. Transport and Remediation. 2a.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. Chap. 7,8,10,12,13.
- (7). COOKSON, J. Bioremediation Engineering Design and Application. 2a.ed. Texas: Mc Graw Hill, 1995. pp. 314-319.

- (8). ERCOLI, E., VIDELA, C., CALLEJA, C. y otros. Biorremediación de Suelos por Técnica de Acumulación Aireada. 4° Jornadas de Preservación de Agua, Aire y Suelo en la Industria de Petróleo y de Gas. Colombia. 3-6 de oct,1999. Bogotá: Hispano-Americana, 2000. v.2.
- (9). ETTEMA, C. Spatial Soil Ecology. Texas: Trends Ecol, 2002. V.17. pp.177-183.
- (10). EWEIS, J. Bioremediation Principles. 3ra.ed. Malaysia: Mc Graw Hill, 1998. pp. 88.
- (11). HENDRIX, P. Components of Sustainable Agroecosystems: Sustainable Agricultural Systems. 2a.ed. Toronto: Soil and Water Commun, 1990. pp. 696.
- (12). KENNEDY, A., AND PAPENDICK, R. Microbial Characteristics Of Soil Quality. Journal Of Il And Water Conservation. USA. 5-6 de feb, 1995. V.2. Los Angeles: Limusa, 1996. v.2.
- (13). INSAM, H. Developments in Soil Microbiology. 4ta.ed. New York: Geoderma, 2001. pp. 389-402.

- (14). KIELY, G. Fundamentos, Entorno, Tecnologías y Sistemas de Gestión.
3ra.ed. Madrid: Tecnos, 2001. pp. 60-62.
- (15). KING, R., Long, G and Sheldon, A. Practical Environmental Bioremediation.
4ta.ed. Florida: Lewis, 1992. pp. 85.
- (16). LOSSER, C. Microbial Degradation of Hydrocarbons in Soil During
Aerobic/anaerobic Changes and Under Purely Aerobic Conditions.
2a.ed. Toronto: Biotech, 2001. pp. 631-636.
- (17). MAROTO, A. Sistemas de Biorremediación de Suelos y Aguas
Contaminadas por Hidrocarburos. 3ra.ed. Barcelona: Geocisa, 2001.
pp. 896.
- (18). NUNAN, N. Spatial Distribution of Bacterial Communities and Their
Relationships with the Micro-structure of Soil. 2a.ed. Florida:
Microbiol, 2003. pp. 203-215.
- (19). PAZMIÑO, J. Biorremediación de Suelos Contaminados con Petróleo.
4ta.ed. Caracas: Dias de Santos, 2002. pp. 156.
- (20). REGISTRO OFICIAL DEL ECUADOR, Quito, Ecuador, Reglamento
Ambiental de las Operaciones Hidrocarburiíferas en el Ecuador, 13 de
Febrero, 2001. Número 445, 2001. pp. 11-19.

- (21). SEMPLE, K. Impact of Composting Strategies on the Treatment of Soils Contaminated with Organic Pollutants. 2a.ed. San Francisco: Environ Pollution, 2001. pp. 269-283.
- (22). SEOÀNEZ, M. Contaminación del Suelo. 3ra.ed. Madrid: Géminis, 1999. pp. 170 – 171,178.
- (23). SMITH, J., and PAUL, E. The Significance of Soil Microbial Biomass Estimations in. Soil Biochem. New York: Penn Well, 1990. V.6. pp. 148.
- (24). TEMPEST, D. The Biochemical Significance of Microbial Growth. 3ra.ed. Oklahoma: Biochem, 1999. pp. 180 - 184.
- (25). VAN DEUREN, J. Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. 3ra.ed. New York: Technology Innovation Office, EPA, 2002. pp. 220.

BIBLIOGRAFIA DE INTENET

(26). EL PETRÓLEO

www.wikipedia.org

Fecha de consulta: 19 de Marzo del 2007

(27). FACTORES INFLUYENTES SOBRE LA COMUNIDAD MICROBIANA

www.cibernetia.com/tesis_es/CIENCIAS_DE_LA_VIDA/

Fecha de consulta: 25 de Abril del 2007

(28). GUÍA TÉCNICA DE ATENUACIÓN NATURAL MONITORIZADA EN
EMPLAZAMIENTOS CONTAMINADOS. TÉCNICAS DE
BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN PARA LA POTENCIACIÓN DE
LA BIODEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES.

http://www.biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/id/3906482.

Fecha de consulta: 18 Junio del 2007

(29). HIDROCARBUROS "EL PETRÓLEO"

<http://www.monografias.com/trabajos/petroleo2/petroleo2.shtml>.

Fecha de consulta: 22 de Marzo del 2007

(30). LA MICROBIOLOGIA DEL SUELO EN LA ERA DE LA BIOLOGÍA
MOLECULAR

http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=116&Id_Categoria=2&tipo=portada

Fecha de consulta: 14 de Octubre del 2007

(31). MICROBIOLOGIA DEL PETROLEO Y SUS DERIVADOS

<http://biblioweb.unam.mx/libros/microbios/Cap2/>

Fecha de consulta: 20 de Agosto del 2007

(32). TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE RIESGO PARA LA REMEDIACIÓN DE
SUELOS Y AGUAS SAUBTERRÀNEAS CONTAMINADOS POR
HIDROCARBUROS

www.invenia.es/oai:www.recercat.net:2072/3035

Fecha de consulta: 30 de Agosto del 2007

(33). TECNOLOGÍAS DE REMEDIACIÓN DIVISIÓ CONSULTORÀ Y
OBRAS AMBIENTALES

<http://www.eco2site.com/informes/lihue.asp>

Fecha de consulta: 09 de Septiembre del 2007

(34). REMEDIACIÓN DEL PASIVO AMBIENTAL EN EL PANTANO
ALEDAÑO A LA ESTACIÓN SACHA CENTRAL

www.biorremediacion.org/contenido/biorremediacion/docs.html - 14k

Fecha de consulta: 12 de Agosto del 2007

ANEXOS

ANEXO A

Fotografías

A 1. Sitio destinado donde se implemento el tratamiento(bioceldas)



A 2. Crudo en el sumidero de la Generadora



A 3. Suelo contaminado



A 4. Traslado del suelo contaminado



A 5. Impermeabilización de la biocelda y sumidero



A 6. Sección del laboratorio ambiental de Petroproducción (LABPAM)



ANEXO B

B 1. ANÀNLISIS ESTADÍSTICO

Function: ANOVA-1

Data case 1 to 12

Two-way Analysis of Variance over

Variable 1 (BLOQUES) with values from 1 to 3 and over

Variable 2 (TRATAMIENTOS) with values from 1 to 4.

Variable 3: TPH

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob
BLOQUES	2	42266.17	21133.083	0.69	0.5372
TRATAMIENTOS	3	241439928.25	80479976.083	2629.31	0.0000
ERROR	6	183652.50	30608.750		
Non-additivity	1	7632.59	7632.589	0.22	
Residual	5	176019.91	35203.982		
Total	11	241665846.92			

Grand Mean = 24079.583 Grand Sum = 288955.000 Total Count = 12

Coefficient of Variation = 0.73%

lsd at 0.05 alpha level = 349.539

Variable 4: NIQUEL

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob
BLOQUES	2	0.00	0.000	0.25	0.7838
TRATAMIENTOS	3	0.51	0.170	132.52	0.0000
ERROR	6	0.01	0.001		
Non-additivity	1	0.00	0.000	0.14	
Residual	5	0.01	0.001		
Total	11	0.52			

Grand Mean = 5.028

Grand Sum = 60.330

Total Count = 12

Coefficient of Variation = 0.71%

lsd at 0.05 alpha level = 0.071

Variable 5: PLOMO

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob
BLOQUES	2	0.00	0.001	5.95	0.0377
TRATAMIENTOS	3	0.08	0.028	185.31	0.0000
ERROR	6	0.00	0.000		
Non-additivity	1	0.00	0.001	9.94	0.0253
Residual	5	0.00	0.000		
Total	11	0.09			

Grand Mean = 5.967

Grand Sum = 71.600

Total Count = 12

Coefficient of Variation = 0.21%

lsd at 0.05 alpha level = 0.025

B 2. PRUEBA DE TUKEY PARA TPH

Case Range: 13 – 16

Variable 3: TPH

Error Mean Square = 30610.

Error Degrees of Freedom = 6

No. of observations to calculate a mean = 3

Tukey's Honestly Significant Difference Test

$S_x = 101.0$ at $\alpha = 0.050$

Original Order		Ranked Order	
Mean 1 = 25520.	B	Mean 4 = 30420.	A
Mean 2 = 18200.	D	Mean 1 = 25520.	B
Mean 3 = 22170.	C	Mean 3 = 22170.	C
Mean 4 = 30420.	A	Mean 2 = 18200.	D

B 3. PRUEBA DE TUKEY PARA NIQUEL

Case Range: 13 - 16

Variable 4: NIQUEL

Error Mean Square = 0.001000

Error Degrees of Freedom = 6

No. of observations to calculate a mean = 3

Tukey's Honestly Significant Difference Test

$S_x = 0.01826$ at $\alpha = 0.050$

Original Order			Ranked Order		
Mean	1 = 4.923	B	Mean	4 = 5.380	A
Mean	2 = 4.860	B	Mean	3 = 4.947	B
Mean	3 = 4.947	B	Mean	1 = 4.923	B
Mean	4 = 5.380	A	Mean	2 = 4.860	B

B 4. PRUEBA DE TUKEY PARA PLOMO

Case Range: 13 - 16

Variable 5: PLOMO

Error Mean Square = 0.0001530

Error Degrees of Freedom = 6

No. of observations to calculate a mean = 3

Tukey's Honestly Significant Difference Test

$S_x = 0.007141$ at $\alpha = 0.050$

Original Order			Ranked Order		
Mean	1 = 5.943	B	Mean	4 = 6.110	A
Mean	2 = 5.910	BC	Mean	1 = 5.943	B
Mean	3 = 5.903	C	Mean	2 = 5.910	BC
Mean	4 = 6.110	A	Mean	3 = 5.903	C