

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

FACULTAD DE INGENIERÍA GEOLÓGICA, MINERA,  
METALÚRGICA Y GEOGRÁFICA

UNIDAD DE POST GRADO

**Biorremediación de suelos contaminados por  
hidrocarburos mediante compost de aserrín y  
estiércoles**

TESIS

Para optar el grado de Magister en geografía mención:

Ordenamiento y Gestión Ambiental

AUTOR

Hildebrando Buendía Ríos

Lima – Perú

2012

## **DEDICATORIA**

A mi asesor Dr. Carlos Cabrera Carranza y docentes de la escuela académica profesional de: Geografía, Minas, Geología e Ingeniería Geográfica por su apoyo y consejos sabios para la elaboración de la presente tesis.

A mis queridos estudiantes, para que les sirva de apoyo y guía en sus investigaciones futuras.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi querida esposa por su apoyo constante, y a mis hijos quienes son mi fuente de inspiración y superación personal y profesional.

**INDICE GENERAL**

	Nº	Pág.
<b>CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN</b>		<b>1</b>
1.1. SITUACIÓN PROBLEMÁTICA		1
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA		2
1.3. JUSTIFICACIÓN TEÓRICA		2
1.4. JUSTIFICACIÓN PRÁCTICA		4
1.5. JUSTIFICACIÓN METODOLÓGICA		4
1.6. JUSTIFICACIÓN ECONÓMICA		5
1.7. OBJETIVO		5
1.7.1. OBJETIVO GENERAL		5
1.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS		5
<b>CAPITULO 2: MARCO TEORICO</b>		<b>6</b>
2.1. MARCO EPISTEMOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN		6
2.2. ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN		7
2.3. BASES TEÓRICAS		10
2.3.1. HIDROCARBUROS		10
2.3.2. BIORREMEDIACION DE HIDROCARBUROS		15
2.3.3. BENEFICIOS DEL ESTIÉRCOL Y ASERRÍN		22
2.3.4. IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS EN LA DESCOMPOSICIÓN DE MATERIA ORGÁNICA		24

2.3.5. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PROCESO DE DEGRADACIÓN DEL ESTIÉRCOL Y ASERRÍN	26
<b>CAPITULO 3: METODOLOGÍA</b>	<b>29</b>
3.1. HIPÓTESIS	29
3.2. VARIABLE DEPENDIENTE (V.D)	29
3.3. VARIABLE INDEPENDIENTE (V.I)	29
3.4. TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	29
3.5. MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS EN EL EXPERIMENTO	29
3.5.1. MATERIALES	29
3.3.2. EQUIPOS	31
3.6. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO	31
3.7. UBICACIÓN	31
3.8. MUESTREO DE SUELOS	32
3.9. DISTRIBUCION DEL DISEÑO EXPERIMENTAL (DCA)	34
3.10. DOSIFICACION DEL EXPERIMENTO	37
3.11. INSTALACIÓN DEL EXPERIMENTO	37
3.12. ESTIMADORES ESTADÍSTICOS	43
3.13. MEDICIÓN DE LAS VARIABLES DE LA PLANTA DE MAÍZ	44
3.14. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE LOS TRATAMIENTOS PARA EL ANÁLISIS SUELOS	44
<b>CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>45</b>
4.1. ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45

4.1.1. ANÁLISIS INICIAL DE LA CONCENTRACIÓN DE TPH	45
4.1.2. ANÁLISIS INICIAL DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL SUELO CONTAMINADO.	46
4.1.3. ANÁLISIS DE LA ALTURA DE LA PLANTA DE MAÍZ	46
4.1.4. ANÁLISIS DEL PESO SECO FOLIAR DE LA PLANTA DE MAÍZ	49
4.1.5. ANÁLISIS DEL PESO SECO RADICULAR DE LA PLANTA DE MAÍZ.	51
4.1.6. ANÁLISIS FINAL DE LA CONCENTRACIÓN DE TPH EN LOS TRATAMIENTOS	53
4.2. RESULTADOS FINALES	54
<b>CAPITULO 5: IMPACTOS DE BIORREMEDIACION</b>	<b>59</b>
5.1. PROPUESTA PARA LA BIORREMEDIACION DE SUELOS CONTAMINADOS A NIVEL DE PRUEBA PILOTO	59
5.2. COSTOS DE IMPLEMENTACIÓN DE LA PROPUESTA	61
5.3. BENEFICIOS QUE APORTA LA PROPUESTA	62
5.3.1. IMPACTOS POSITIVOS	62
5.3.2. IMPACTOS NEGATIVOS	63
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>64</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>66</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>67</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>71</b>

## INDICE DE CUADROS

	N°	Pág.
<b>CUADRO 01.</b> VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAS TECNOLOGIAS DE REMEDIACION		09
<b>CUADRO 02.</b> VALORES ÓPTIMOS PARA EL PROCESO DE BIORREMEDIACION DE SUELOS		20
<b>CUADRO 03.</b> PLANTAS CON POTENCIAL PARA REDUCIR LA CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBUROS EN LOS SUELOS		21
<b>CUADRO 04.</b> ORGANISMOS QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE ESCOMPOSICION		25
<b>CUADRO 05.</b> CONDICIONES DESEABLES EN EL PROCESO DE DEGRADACIÓN DEL ESTIÉRCOL Y ASERRÍN		26
<b>CUADRO 06.</b> PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTIERCOLES ORGÁNICOS		28
<b>CUADRO 07.</b> COMPOSICIÓN QUÍMICA Y RELACIÓN CARBONO-NITRÓGENO DE LOS ASERRINES UTILIZADOS EN EL BIOENSAYO		28
<b>CUADRO 08.</b> PRESENTACIÓN DE TRATAMIENTOS		37
<b>CUADRO 09.</b> COMBINACIÓN DE LOS 12 TRATAMIENTOS DEL EXPERIMENTO		38
<b>CUADRO 10.</b> RESULTADO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE TPH POR TRATAMIENTO		45
<b>CUADRO 11.</b> ANALISIS DE LAS PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DEL SUELO		46
<b>CUADRO 12.</b> PROMEDIO DE ALTURA DE PLANTA (Cm) DE MAÍZ PARA LOS 12 TRATAMIENTOS		47
<b>CUADRO 13.</b> PRUEBA DE TUCKEY DE LOS DATOS DE ALTURA DE PLANTA DE MAÍZ PARA LOS 12 TRATAMIENTOS EVALUADOS		48
<b>CUADRO 14.</b> PROMEDIO DEL PESO SECO FOLIAR (gr) PARA LOS 12 TRATAMIENTOS EVALUADOS		49
<b>CUADRO 15.</b> PRUEBA DE TUCKEY DE LOS DATOS DEL PESO SECO FOLIAR DE LA PLANTA DE MAÍZ PARA LOS 12 TRATAMIENTOS EVALUADOS		50
<b>CUADRO 16.</b> PROMEDIO DEL PESO SECO RADICULAR (gr) DE LA PLANTA DE MAÍZ PARA LOS 12 TRATAMIENTOS EVALUADOS		51

<b>CUADRO 17.</b> PRUEBA DE TUCKEY DE LOS DATOS DEL PESO SECO RADICULAR (gr) DE LA PLANTA DE MAÍZ PARA LOS 12 TRATAMIENTOS EVALUADOS	52
<b>CUADRO 18.</b> RESULTADO DE LA CONCENTRACIÓN FINAL DE HIDROCARBUROS POR TRATAMIENTO	53
<b>CUADRO 19.</b> CONCENTRACIONES DE HIDROCARBUROS POR TRATAMIENTO Y PROMEDIOS DE ALTURA DE PLANTA, PESO SECO FOLIAR Y PESO SECO RADICULAR	54
<b>CUADRO 20.</b> CONCENTRACIONES DE TPH INICIAL Y FINAL PARA EL EXPERIMENTO Y PORCENTAJE DE REDUCCION DE TPH	57
<b>CUADRO 21.</b> RANKING DE REDUCCION	58
<b>CUADRO 22.</b> COSTO DE IMPLEMENTACION AL PRIMER AÑO	61
<b>CUADRO 23.</b> COSTO DE IMPLEMENTACION DEL AÑO 02 AL AÑO 05	62



**INDICE DE FIGURAS**

	N°	Pág.
<b>FIGURA 01.</b> PROCESO DE DESCOMPOSICION DE LA MATERIA ORGANICA		25
<b>FIGURA 02.</b> MAPA DEL COMPLEJO DE ALMACENAMIENTO DE PETROLEO DE LA REFINERIA LA PAMPILLA		32
<b>FIGURA 03.</b> AREA DE RECOLECCION DE MUESTRAS DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS		33
<b>FIGURA 04.</b> RECOJO DE ESTIERCOL PARA EL EXPERIMENTO		34
<b>FIGURA. 05.</b> PREPARACION DE LOS TRATAMIENTOS DEL EXPERIMENTO		35
<b>FIGURA. 06.</b> DISTRIBUCIÓN DE TRATAMIENTOS DE ACUERDO AL DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR		36
<b>FIGURA 07.</b> PLANO DE UBICACIÓN DEL TALLER DE FERTILIDAD DE SUELOS -UNALM		38
<b>FIGURA 08.</b> PRUEBA DE VIABILIDAD DE LA SEMILLA DE MAIZ		39
<b>FIGURA 09.</b> INSTALACIÓN DEL EXPERIMENTO CON LOS TRATAMIENTOS		40
<b>FIGURA 10.</b> RIEGO DE PLANTAS DE MAÍZ BAJO CONDICIONES NATURALES		41
<b>FIGURA 11.</b> CRECIMIENTO DE LA PLANTA DE MAÍZ A LOS 15 DÍAS, BAJO CONDICIONES NATURALES		41
<b>FIGURA 12.</b> CRECIMIENTO DE LA PLANTA DE MAÍZ A LOS 25 DÍAS, CONDICIONES NATURALES		42
<b>FIGURA 13.</b> CRECIMIENTO DE LA PLANTA DE MAÍZ A LOS 35 DÍAS, BAJO CONDICIONES NATURALES		42

**INDICE DE GRÁFICOS**

	Nº	Pág.
GRAFICO 01. DISTRIBUCIÓN DE LOS PRINCIPALES DERIVADOS DEL PETRÓLEO		12
GRAFICO 02. COMPOSICION VOLUMETRICA DE UN SUELO FRANCO		19
GRAFICO 03. PROCESO DE DEGRADACION DE UN HIDROCARBURO		20
GRAFICO 04. ALTURA PROMEDIA DE PLANTA (Cm)		47
GRAFICO 05. PESO SECO FOLIAR POR REPETICIONES (gr)		50
GRAFICO 06. PESO SECO RADICULAR POR REPETICIONES (gr)		52
GRAFICO 07. ALTURA PROMEDIO DEL MAIZ POR TRATAMIENTO		55
GRAFICO 08. PESO SECO FOLIAR PROMEDIO DEL MAIZ POR TRATAMIENTO		56
GRAFICO 09. PESO SECO RADICULAR PROMEDIO DEL MAIZ POR TRATAMIENTO		56
GRAFICO 09. RANKING DE REDUCCION POR TRATAMIENTO		58

## RESUMEN

La biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos es una técnica que consiste en usar organismos vivos para el consumo de los hidrocarburos de petróleo en el suelo. Esta alternativa de bajo costo permite la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, reduciendo las concentraciones a niveles que no son tóxicos para las plantas (5000 mg/kg de suelo). Para confirmar o descartar la disminución de Hidrocarburos Totales de Petróleo de un suelo de la Refinería la Pampilla, ubicado en Carretera Ventanilla Km 25. Distrito, Ventanilla. Provincia, Callao. Se instaló el experimento a nivel de bioensayo, en el Laboratorio de Fertilidad de suelos de la Universidad Nacional Agraria la Molina, aplicándose el modelo estadístico de Diseño Experimental Completamente al Azar (DCA), con tres repeticiones y doce tratamientos sumando un total de 36 macetas experimentales, para lo cual se empleó estiércol y aserrines como sustrato a la planta indicadora de “maíz” *Zea mays*, L sembrados y controlados por un periodo de dos meses. Los resultados de la dosificación del suelo contaminado por hidrocarburos, estiércol y aserrín en promedio disminuyo 22.5 por ciento el contenido de hidrocarburos en el suelo empleando solo estiércol disminuyo solo 16.5 por ciento y usando solamente aserrines disminuyo 9.6 por ciento. Lo cual se ha corroborado y complementado con los resultados de la planta indicadora maíz, de las variables altura de la planta, peso seco foliar y peso seco radicular respectivamente.

Comparando los tratamientos del experimento el que mejor ha remediado los suelos fue el tratamiento (T3) suelo contaminado mas vacaza mas aserrín de bolaina, puesto que la concentración inicial de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) fue de de 21.81 gr de TPH/kg de suelo, ha disminuido en 16.28 gr de TPH/kg de suelo, que representa una reducción del 25 por ciento. Siendo este tratamiento lo más recomendable a usar.

Palabras Clave: Biorremediacion, hidrocarburos, estiércol orgánico, aserrín.

## SUMMARY

The biorremediación of ground contaminated by hydrocarbons is a technique that consists of using alive organisms for the consumption of the hydrocarbons of petroleum on the ground. This alternative of low cost permits the recovery of ground contaminated with hydrocarbons of petroleum, reducing the concentrations to levels that are not toxic for the plants (5000 mg/kg of ground). To confirm or to rule out the decrease of Total Hydrocarbons of Petroleum of a ground of the Refinery "La Pampilla", located in "Km 25 highway Ventanilla", Province, "Callao".

The experiment to level was installed of biotest, in the ground Fertility Laboratory of the "Universidad Nacional Agraria la Molina", being applied the statistical model of Experimental Design Completely at random (DCA), with three repetitions and twelve processing adding a total of 36 experimental flowerpots, for which manure was employed and sawdust as substrate to the warning plant of "corn" *Zea mays*, L sown and controlled by a period Of two months.

The results of the dosage of the ground contaminated by hydrocarbons, manure and sawdust on the average I diminish 22,5 percent the content of hydrocarbons on the ground employing alone manure I diminish alone 16,5 percent and using only sawdust I diminish 9,6 percent. Which has been corroborated and complemented with the results of the plant warning corn, of the variable height of the plant, dry weight to number and dry weight radicular respectively.

Comparing the processing of the experiment the one that better has remedied the floors was the processing (T3) floor contaminated but "vacaza" but sawdust of "bolaina", since the initial concentration of total hydrocarbons of petroleum (TPH) was of 21,81 gr of TPH/kg of ground, has diminished in 16,28 gr of TPH/kg of ground, that represents a 25 percent reduction. Being this processing it but recommendable to use.

Keywords: Biorremediación, hydrocarbons, organic manure, sawdust.

## **CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Situación problemática**

En el Perú y en el mundo existen refinerías de petróleo que producen compuestos derivados que son producidos y transportados para su uso en diferentes actividades industriales, (grifos, cisternas y otros) que contaminan el suelo y a pesar del cuidado que puede tenerse en su manejo y almacenamiento, existe la posibilidad de que estos compuestos ingresen al suelo en cantidades que superen el cinco por ciento que es el nivel establecido por el <sup>1</sup>MEM.

En el país sobre estos suelos contaminados, no existe información Estadística oficial sobre la ubicación y extensión de las áreas afectadas y su disposición adecuada de los productos y residuos de la industria del petróleo, a pesar de la álgida tarea del Ministerio de Energía y Minas (MEM), autoridad ambiental competente para las actividades petroleras en nuestro país.

Esto es un problema muy importante que requiere que los suelos contaminados con hidrocarburos sean remediados con tecnologías de bajo costo y de fácil acceso y evitar la contaminación de las aguas subterráneas.

El MEM a través de su “Guía Ambiental para la Restauración de Suelos en Instalaciones de Refinación y Producción Petrolera” y su Guía para el Manejo de Desechos de las Refinerías de Petróleo”, apoya y estimula el empleo de diferentes técnicas para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos, entre las que se encuentran la biorremediación.

Existen otras técnicas biológicas que se basan en la capacidad de los microorganismos y las plantas para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos y transformarlos en productos metabólicos inocuos o menos tóxicos (Instituto Nacional de Ecología, 2003).

---

<sup>1</sup> Ministerio de Energía y Minas. (Perú)

Estas técnicas de biorremediación, no usan agentes químicos y tienen costos de implementación más bajos respecto a otras técnicas. Por estos motivos tienen una mayor aceptación y han sido empleadas con éxito en otros países. (Navarro et al, 2001). Manifiesta que en nuestro país ya se han empleado técnicas de remediación, la refinería La Pampilla inició en 1999 un proyecto de remediación empleando biopilas para tratar los suelos del área de playa afectados por la disposición de residuos de hidrocarburos y subproductos de petróleo, mientras que en Lobitos (Talara), se ha reportado la remediación de suelos con concentraciones de TPH del 30,5% empleando la técnica del "Landfarming" con buenos resultados y costo alto. El mismo autor agrega que el número de estudios de remediación para determinar un estándar ambiental para los hidrocarburos en el Perú es muy limitado. Pero se ha encontrado una mayor sensibilidad en los cultivos alimentarios realizados en otros países. En la mayoría de los casos para un suelo, dependiendo de su valor de uso debería ser menor a cinco por ciento de sólidos totales de hidrocarburos antes de ser incorporado en algún ambiente.

Por lo expresado la tecnología de la biorremediación de suelos es factible especialmente con materia prima simple como estiércol, aserrín, cuyos costos de remediación son bajos.

## **1.2. Formulación del problema**

¿En qué medida la aplicación de la biorremediación a base de estiércol y aserrín, tomando como indicador a la planta de maíz (*Zea maíz.L*); permitirá la recuperación de los suelos contaminados con hidrocarburos?

## **1.3. Justificación teórica**

Las actividades de perforación, explotación, refinación y comercialización del petróleo generan diversos tipos de residuos, los cuales se han vertido sobre los suelos durante décadas, debido a un inadecuado manejo e insuficiente sensibilización ambiental. Como consecuencia, dichos suelos han reducido considerablemente su capacidad natural para sostener a una gran variedad de organismos, restringiendo su capacidad original a tan sólo algunas

bacterias oleofílicas, dejando los suelos inutilizables para cualquier tipo de actividad productiva que se quiera realizar (Guerrero, 2002). La aplicación de la biorremediación y restauración de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, surge como una alternativa viable, ecológica y de gran aceptación. En nuestro país ya se ha iniciado la ejecución de proyectos de biorremediación que consideran la aplicación de esta técnica y se espera que en los próximos años su empleo se incremente.

Dado que todo proyecto de biorremediación tiene como uno de sus principales objetivos la recuperación de la calidad del suelo contaminado, resulta importante evaluar su costo -efectividad.

Para aplicar la técnica de la biorremediación como alternativa de tratamiento para los suelos se ha considerado los siguientes criterios a) Los organismos deben tener la actividad metabólica necesaria para degradar el contaminante a una velocidad razonable para alcanzar el nivel guía. b) Las condiciones deben propiciar la actividad del micro organismo y el costo del proceso debe ser menor o en el peor de los casos no más costoso que otras tecnologías para remover el contaminante (Espinoza 1,999)

La contaminación de suelos con hidrocarburos es un problema creciente que ha llevado al desarrollo e implementación de tecnologías para la remediación y recuperación de los ambientes contaminados. Las tecnologías de remediación pueden clasificarse de diferentes maneras, sobre la base de los siguientes principios: (i) Estrategia de remediación; (ii) Lugar en que se realiza el proceso de remediación y, (iii) Tipo de tratamiento.

Según el Instituto Nacional de Ecología, (2003). Establece que de acuerdo al tipo de tratamiento, las tecnologías de remediación pueden clasificarse en tres grupos:

G1: Tratamientos biológicos: Utilizan las actividades metabólicas de ciertos organismos (plantas, hongos, bacterias) para degradar, transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos.

G2: Tratamientos fisicoquímicos: Utilizan las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para separar o contener la contaminación.

G3: Tratamientos térmicos: Que utilizan calor para incrementar la volatilización, quemar, descomponer o fundir (inmovilización) los contaminantes en un suelo.

La selección de un tratamiento debe considerar los siguientes factores: tipo de hidrocarburos, concentración del hidrocarburo, características del lugar donde se realizará la remediación, normativa ambiental, costos y tiempo disponible para la remediación (Espinoza 1,999).

Los tratamientos fisicoquímicos están más establecidos actualmente. Sin embargo, su empleo no permite una degradación completa de los contaminantes y además, requieren una alta inversión.

Cuando se emplea una técnica biológica se presenta una situación inversa. Los contaminantes son biodegradados y los costos de implementación son bajos. Por esta razón, existe una tendencia creciente a emplear tratamientos biológicos.

#### **1.4. Justificación práctica.**

La biorremediación, mediante la aplicación de estiércol y aserrín, se constituye en una técnica de fácil ejecución y de bajo costo por el acceso al insumo remediador. Si se logra llevar a nivel no solo de laboratorio (bioensayos), si no de manera industrial y funcional; será un logro importante para el país, pues existen gran cantidad de suelos contaminados por hidrocarburos.

Estas aplicaciones se realizan generalmente de año en año dependiendo del tipo de bacterias que se introduzcan en el suelo contaminado con hidrocarburos. Es muy importante usar plantas nativas que crecen en el mismo campo contaminado. (Espinoza, 2011)

#### **1.5. Justificación metodológica.**

La metodología a emplear es del tipo experimental, ya que se tiene muestra de suelos contaminados por hidrocarburos, a las que se les va a remediar



con aserrín y estiércol, con diferentes tratamientos y como indicador se tiene el desarrollo de la planta de maíz, *Zea mays L.* de la variedad Marginal. T-28; por lo que es pertinente el método experimental.

## **1.6. Justificación económica**

Existen muchos métodos de remediación de suelo, pero es necesario buscar métodos de bajo costo y fácil acceso, como el que empleamos en este trabajo, solo aserrín y estiércol.

## **1.7. Objetivo**

### *1.7.1. Objetivo general*

- Determinar la recuperación de un suelo contaminado con hidrocarburos, usando aserrín y estiércol, empleando como planta indicadora al “maíz” *Zea mays L.* de la variedad Marginal. T-28.

### *1.7.2. Objetivos específicos*

- Evaluar las variaciones del crecimiento de “maíz” *Zea mays L.* con relación a diferentes tratamientos.
- Reconocer la concentración de hidrocarburos en el suelo después de haber sido cultivado con “maíz” *Zea mays.L.*

## **CAPITULO 2: MARCO TEORICO**

### **2.1. Marco epistemológico de la investigación**

La aplicación de microorganismos tanto bacterias, algas, hongos, nematodos y plantas, se pueden utilizar para desarrollar un proceso de biorremediación.

Las bacterias, son seres vivos con mayor capacidad metabólica del planeta, pueden degradar prácticamente cualquier sustancia orgánica. Si la sustancia se degrada completamente se habla de mineralización; este es el proceso ideal, pero no siempre ocurre. Algunas sustancias no son degradadas sino transformadas en otras (biotransformación).

La biotransformación puede ser peligrosa, ya que la nueva sustancia formada puede ser tan o menos nociva, es decir hay sustancias que no son degradadas y se las denomina recalcitrantes, estas se acumulan durante mucho en el medio ambiente, especialmente si además son resistentes a procesos físico/químicos como la radiación. Las bacterias además pueden eliminar los contaminantes en ambientes donde hay oxígeno (llamados aeróbicos), pero también en ambientes sin oxígeno (llamados anaeróbicos), ya que pueden respirar otras sustancias diferentes al oxígeno (aceptores de electrones), como por ejemplo el nitrato, el sulfato, el hierro, el manganeso, el selenio, etc.

Todos aquellos contaminantes que puedan ser degradados o transformados por los seres vivos son susceptibles de ser eliminados mediante procesos de biorremediación. Los compuestos orgánicos suelen ser degradados total o parcialmente y eliminados por completo del ecosistema. Por ejemplo, compuestos contaminantes tales como el tolueno, el fenol o los polibifenilos clorados (PCBs) pueden ser utilizados como fuente de carbono por bacterias, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.

Los tipos de bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia* o *Mycobacterium* pueden eliminar hidrocarburos aromáticos como el tolueno o el naftaleno, pesticidas como las antrazinas, aditivos de la gasolina como

el tricloruro de etilo o sustancias venenosas como el cianuro potásico, tanto de ambientes sólidos en el suelo, como líquidos en los ríos y mares, ocurridos frecuentemente por derrames. Espinoza (2011)

## **2.2. Antecedentes de la investigación**

En el Perú, la normativa ambiental relacionada al manejo de los hidrocarburos de petróleo en nuestro país es propuesta por el Ministerio de Energía y Minas (MEM), autoridad ambiental competente para las actividades del sector hidrocarburos competente para las actividades del sector hidrocarburos de acuerdo al D.S. N° 053-99-EM del 28 de setiembre de 1999. La Ley Orgánica de Hidrocarburos Ley # 26221 del 13 de agosto de 1993, y sus normas modificatorias (Ley # 26734 del 31/12/96 y Ley # del 07/12/2000), es la norma base que regula las actividades de hidrocarburos en el territorio nacional. El artículo 872 de esta ley establece que las personas naturales o jurídicas que desarrollen actividades de hidrocarburos deberán cumplir con las disposiciones sobre protección al medio ambiente, las cuales se detallan en el Reglamento de Protección Ambiental de las Actividades de Hidrocarburos - D.S. N 046-93-EM (12)11/93) y normas modificatorias (D.S. # 009-95-EM del 13/05/95, D.S. # 053-99-EM del 27/09/99 y D.S. # 003-2002- EM del 27/01/02).

El MEM a través de su “Guía Ambiental para la Restauración de Suelos en Instalaciones de Refinación y Producción Petrolera” y su “Guía para el Manejo de Desechos de las Refinerías de Petróleo” también recomienda el empleo de diferentes técnicas para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos, entre las que se encuentran las técnicas biológicas, como la biorremediación, fitorremediación, así como la técnica de landfarming.

Cooney et, al. (1985), afirma que el petróleo es una mezcla altamente compleja compuesta por una gran variedad de hidrocarburos. Los hidrocarburos son compuestos orgánicos formados solamente por hidrogeno y carbono, tanto el petróleo crudo como sus derivados contienen diversos tipos

de hidrocarburos cuyas proporciones relativas varían entre las diferentes clases de estos compuestos.

La gasolina, por ejemplo, contiene más de 100 sustancias diferentes, mientras que el kerosene puede tener hasta 10,000 hidrocarburos distintos. Los hidrocarburos derivados de las actividades petroleras son los compuestos contaminantes más comunes en la naturaleza. Su presencia ha sido detectada en componentes vivos e inertes de los ecosistemas. La composición de productos de petróleo liberados en el ambiente varía significativamente dependiendo de la fuente, intemperización y movimiento diferencial de los componentes del medio.

Ocampo (2002), refiere que la utilización de la técnica de landfarming, se disponen en áreas denominadas “unidades de tratamiento” o “celdas de tratamiento”, las cuales se construyen considerando medidas para evitar el transporte de contaminantes hacia otras áreas por infiltración. La base de las celdas de tratamiento se impermeabiliza colocando una capa de arcilla compactada, con un nivel de impermeabilidad de  $10^{-7}$  –  $10^{-8}$  cm/s, o una geomembrana de polietileno de 800 micras.

USEPA, (2003). Recomienda que para la ejecución de evaluaciones periódicas sea necesaria para asegurar el avance del proceso de remediación y ajustar las principales variables del sistema. La medición continua del oxígeno, la concentración de nutrientes, la concentración de bacterias heterótrofas, el pH y el contenido de humedad permiten adecuar la frecuencia de las aireaciones, la tasa de aplicación de nutrientes, la frecuencia volumen de riego y el pH. Dichas evaluaciones deben incluir también la medición de las concentraciones del contaminante para determinar el progreso del sistema de tratamiento.

Escalante, E. (2000). Presenta las ventajas y desventajas de las diferentes tecnologías para remediar suelos contaminados con hidrocarburos según el cuadro 01.

Cuadro 01. Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación.

Biológicos	<p>Ventajas</p> <p>Son tecnologías benéficas al ambiente y de bajo costo</p> <p>Los contaminantes generalmente son destruidos.</p>
	<p>Desventajas</p> <p>Requieren mayores tiempos de tratamientos.</p> <p>Es necesario verificar la toxicidad de productos intermediarios y/o productos finales.</p> <p>No pueden emplearse si el tipo de suelo no favorece el crecimiento microbiano.</p>
Físico-químicos	<p>Ventajas</p> <p>Pueden realizarse en periodos cortos.</p> <p>El equipo es accesible y no se necesita de mucha energía ni ingeniería</p> <p>Desventajas</p> <p>Los residuos generados por técnicas de separación, deben tratarse o disponerse: aumento en costos y necesidades de permisos.</p> <p>Los fluidos de extracción pueden aumentar la movilidad los contaminantes: necesidad de sistema de recuperación.</p>
Térmicos	<p>Ventajas</p> <p>El equipo es accesible y no se necesita de mucha energía.</p> <p>Desventajas</p> <p>Los costos aumentan en función del uso de energía y equipo.</p>

Fuente: Escalante (2000)

## 2.3. Bases teóricas

### 2.3.1. Hidrocarburos

Espinoza, (2011). Los hidrocarburos son compuestos orgánicos formados únicamente por átomos de carbono e hidrogeno. La estructura molecular consiste en un armazón de átomos de carbono a los que se unen los átomos de hidrogeno. Los hidrocarburos son compuestos básicos de la de la química orgánica. Las cadenas de átomos de carbono pueden ser lineal, ramificados, abierto y cerradas.

Escalante, (2000). El hidrocarburo de petróleo crudo y sus productos refinados pueden dividirse en cuatro grupos: (i) <sup>2</sup>hidrocarburos alifáticos, (ii) <sup>3</sup>hidrocarburos cíclicos, <sup>4</sup>(iii) hidrocarburos aromáticos y (iv) <sup>5</sup>compuestos orgánicos polares.

Los hidrocarburos alifáticos o de cadena abierta se dividen a su vez en tres grupos, en función del enlace entre dos átomos de carbono: alcanos (enlace simple), alquenos (enlace doble) y alquinos (enlace triple). Los compuestos alifáticos más comunes son los alcanos, los cuales pueden encontrarse en el petróleo crudo conformando cadenas de cinco a más de treinta y cinco átomos de carbono.

Los hidrocarburos cíclicos son también componentes comunes del petróleo y pueden tener estructuras mono cíclicas, bicíclicas o de más anillos. Los hidrocarburos aromáticos incluyen compuestos mono aromáticos como el

---

<sup>2</sup> Los **hidrocarburos alifáticos** son compuestos orgánicos constituidos por carbono e hidrógeno, en los cuales los átomos de carbono forman cadenas abiertas. Los hidrocarburos alifáticos de cadena abierta se clasifican en alcanos, alquenos y alquinos.

<sup>3</sup> Los **hidrocarburos cíclicos son** compuestos orgánicos formados únicamente por "átomos de carbono e hidrógeno". La estructura molecular consiste en un armazón de átomos de carbono a los que se unen los átomos de hidrógeno.

<sup>4</sup> La familia de los hidrocarburos aromáticos es el benceno. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son un grupo de sustancias químicas que se forman durante la incineración incompleta del carbón, el petróleo, el gas, la madera, las basuras y otras sustancias orgánicas, como el tabaco y la carne asada al carbón, y se las considera potencialmente tóxicas.

<sup>5</sup> La etimología de la palabra PETROLEO, PETRO= roca y OLEUM= aceite, gramaticalmente significa aceite de roca. Si este aceite se analiza para verificar su constitución química orgánica, por contener el elemento Carbono (C) en sus moléculas, se encontrará una extensiva variedad de compuestos formados con hidrogeno (H) denominados HIDROCARBUROS. Los hidrocarburos son gaseosos, líquidos, semisólidos y sólidos, como aparecen en sitios de la superficie terrestre, o gaseosos y líquidos en la formaciones geológicas del subsuelo.

benceno y el tolueno, y compuestos poliaromáticos como el pireno. En éste grupo se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), moléculas formadas por múltiples anillos aromáticos representan entre el 0,2 al 7% del petróleo crudo. Los <sup>6</sup>HAP poseen una limitada solubilidad en agua, se absorben fuertemente al suelo y se degradan a velocidades menores que los hidrocarburos mono aromáticos.

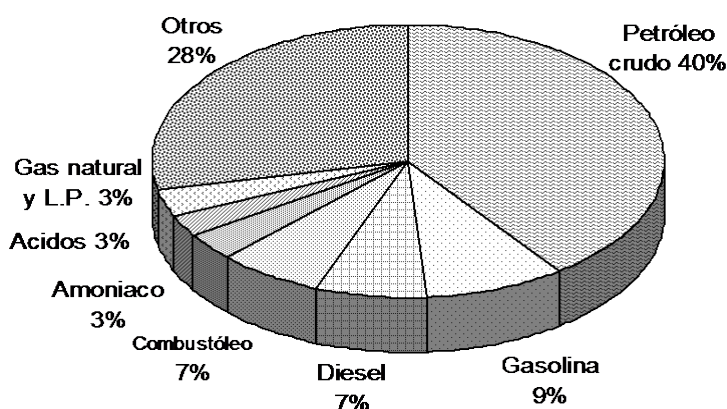
Debido a estas propiedades son altamente tóxicos y considerados como compuestos mutagénicos y cancerígenos. La fracción polar del petróleo crudo está constituida por compuestos que contienen átomos polares de sulfuro, oxígeno y nitrógeno. Respecto a otros componentes del petróleo, esta fracción no es tan representativa y en el caso del nitrógeno su concentración es menor al 1%. Además de los compuestos mencionados, el petróleo puede contener concentraciones variables de metales pesados tales como arsénico, mercurio, níquel, hierro, plomo y zinc.

Morgan *et al.*, (1989 citado por Ocampo *et al.*). Señala que cuando los hidrocarburos ingresan al suelo por la filtración o derrame de un tanque de almacenamiento de petróleo o de un oleoducto, ocurren diferentes procesos que influyen en el destino de estos compuestos en el suelo. Los hidrocarburos pueden propagarse lateralmente en la superficie del suelo o pueden penetrar verticalmente por efecto de la fuerza de gravedad y la capilaridad. En el primer caso se favorece la volatilización de los componentes de bajo peso molecular pero se incrementa el área contaminada y la foto oxidación de los hidrocarburos a compuestos polares más tóxicos. En el segundo caso, a mayor profundidad (lixiviación) se reduce la disponibilidad de oxígeno para la biodegradación y se incrementa el riesgo de contaminar la napa freática. La gran mayoría de hidrocarburos tiene un desplazamiento vertical en los suelos, a excepción de aquellos donde las condiciones climáticas favorecen su saturación con agua o su congelamiento.

---

<sup>6</sup> Grupo de Sustancias químicas, 17 en total con características nocivas.

Dentro de los compuestos peligrosos más comúnmente involucrados en emergencias ambientales, se encuentran el petróleo y sus derivados (gasolinas, combustóleo, diesel), agroquímicos, gas LP y natural, entre otros.



Fuente: Ocampo et al. 1989.

Gráfico 01. Distribución de los principales derivados del petróleo

Existen sustancias como los a) furanos, b) hexaclorobenceno, c) bifenilos, d) policlorados (BPCs), e) plaguicidas organoclorados, f) mercurio, g) plomo, h) cromo, i) cadmio, j) compuestos tóxicos atmosféricos e hidrocarburos poliarmáticos (HAPs.)

**2.3.1.1. Impacto de los hidrocarburos en el suelo.** El suelo es un cuerpo natural que es parte integrante del escenario donde ocurren los ciclos biogeoquímicos, hidrológicos y de la cadena alimentaria. Asimismo, es el espacio donde se realizan actividades agrícolas y ganaderas, y es la base para el establecimiento de áreas verdes. El suelo es un recurso natural complejo, dinámico y su equilibrio depende de la interacción entre sus propiedades físicas, químicas y biológicas.

Escalante, (2000). Los factores que afectan la distribución de los hidrocarburos en los suelos son principalmente el volumen del derrame, la viscosidad del petróleo a la temperatura prevaleciente en el ambiente y la



composición del suelo. Los compuestos de alta viscosidad como el crudo pesado tienden a moverse horizontalmente, mientras que la gasolina y aceites de baja viscosidad penetran fácilmente en el suelo.

El paso de los hidrocarburos a través de la matriz del suelo (lixiviación) depende a su vez de la textura del suelo y la solubilidad de los hidrocarburos en agua. En suelos arcillosos la migración de partículas es más rápida que en suelos francos, dado que los primeros tienen una mayor porosidad (Morgan et al., 1989). Además, en suelos muy arcillosos las moléculas polares pueden ser adsorbidas. Menos del 5% de los compuestos del crudo o productos refinados (principalmente aromáticos de bajo peso molecular e hidrocarburos polares) son solubles en agua (Escalante, 2000).

Luego, gran parte de los hidrocarburos queda retenida en el suelo. La actividad microbiana transforma los hidrocarburos en metabolitos más solubles y por lo tanto más móviles en el suelo, favoreciendo su solubilización y lixiviación.

Martínez *et al.* (2001), El ingreso de hidrocarburos al suelo tiende a producir un efecto de hidrofobicidad, lo que resulta en la disminución de la tasa de infiltración. Los hidrocarburos se acumulan en los poros que se forman entre las partículas del suelo produciéndose una reducción en la disponibilidad de oxígeno y la permeabilidad. reporta cambios en la textura de un suelo arcilloso a migajón arcilloso, a concentraciones de 150 mil ppm de combustóleo, por aumento importante de las arenas y disminución de las arcillas, observando además incrementos importantes en la concentración de materia orgánica a mayor concentración de gasolina y combustóleo. El mismo autor también señala que el incremento de este parámetro se debe principalmente a la presencia de material patogénico recalcitrante, lo cual puede representar un riesgo ecotáxico. Para los parámetros pH, conductividad eléctrica y densidad aparente el mismo autor no reporta variaciones significativas para suelos arcillosos contaminados con diferentes concentraciones de diesel, combustóleo y gasolina.

**2.3.1.2. Impacto de los hidrocarburos en las plantas.** Chayneau, et al. (1996). La gran mayoría de los hidrocarburos de petróleo son considerados compuestos tóxicos. Los efectos de estos compuestos sobre las plantas son en la mayoría de los casos subletales, es decir que no se manifiestan a través de la mortalidad, sino de manera indirecta modificando el crecimiento, la reproducción y la fotosíntesis. Los efectos adversos sobre el desarrollo de las plantas varían en función de la estructura química del hidrocarburo, su concentración en el suelo y la especie de planta. La toxicidad disminuye en el siguiente orden: compuestos aromáticos, naftalenos, olefinas y cadenas no ramificadas parafínicas. Altas concentraciones de hidrocarburos limitan y/o alteran la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas.

Chayneau *et al.* (1996) reporta una reducción de más del 80% en la biomasa seca de las partes aéreas para dos especies: cebada y frejol, observando además síntomas de clorosis en las hojas y alteración del desarrollo vegetativo. La inhibición del crecimiento fue mayor al incrementarse la concentración del contaminante.

**2.3.1.3. Impacto de los hidrocarburos en las semillas.** Chayneau, et al. (1996). Los hidrocarburos de petróleo pueden ingresar a las semillas y alterar las reacciones metabólicas y/o matar al embrión por toxicidad directa aguda. La inhibición de la germinación también está correlacionada con las propiedades hidrofóbicas de los hidrocarburos, las cuales evitan o reducen el intercambio de gases y agua necesario en esta etapa. Evaluaciones sobre la fitotoxicidad de hidrocarburos señalan que la respuesta a la presencia de hidrocarburos durante la germinación varía de una especie y otra. El mismo autor señala que la resistencia de semilla de algunas especies vegetales a los efectos de los hidrocarburos muestra el siguiente orden decreciente: girasol, frejol, trigo, trébol, maíz, cebada, lechuga. También indica que la incidencia de infecciones por hongos incrementa conforme aumenta la concentración de hidrocarburos.

### 2.3.2. Biorremediación de hidrocarburos.

Berkeley, (2011) La biorremediación es el uso de seres vivos para restaurar ambientes contaminados.

Según Burges en (1997), la biodegradación asistida, es el proceso por el cual microorganismos indígenas o inoculados (Bacterias y hongos) metabolizan los contaminantes orgánicos del suelo.

En este proceso los contaminantes orgánicos, son biotransformados por que generalmente los microorganismos pueden utilizarlos para su propio crecimiento como fuente de carbono y energía y, en el caso de que no sean capaces de crecer a partir de ellos, pueden seguir transformándose si se les aporta un sustrato de crecimiento alternativo o cosustrato.

Para el crecimiento de los microorganismos es necesaria la presencia de donadores y aceptores de electrones, una fuente de carbono y nutrientes (N, P, K, S, Mg, Ca, Mn, Fe, Zn, Cu y elementos traza).

El proceso más básico del metabolismo microbiano es la transferencia de electrones desde un sustrato donante hasta un sustrato aceptor.

Los electrones son necesarios para oxidar (reducir) los compuestos orgánicos, que son la fuente de carbono, a la forma química utilizada por los constituyentes celulares y para generar la energía necesaria que posibilite la síntesis y el mantenimiento de la masa.

**2.3.2.1. Bacterias y hongos.** Las poblaciones de bacterias y hongos existentes en los suelos emplean como fuente de carbono a los hidrocarburos de petróleo en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, logrando así su degradación. Algunas de las especies de bacterias con capacidad para degradar hidrocarburos son:

- a. Pseudomonas
- b. Arthrobacter
- c. Alcaligenes
- d. Coiynebacterium

- e. Flavobacterium
- f. Achromobacter
- g. Micrococcus,

Entre las especies de hongos destacan:

- a. Aspergillus,
- b. Cephalosporium,
- c. Cunninghamella,
- d. Torulopsis,
- e. Trichoderma y Saccharomyces.

No todos los compuestos de petróleo se degradan con la misma facilidad por los microorganismos del suelo. Se tiene las siguientes generalizaciones para la biodegradación de hidrocarburos:

Los compuestos alifáticos de cadena lineal (parafinicos) se degradan más fácilmente que los compuestos aromáticos.

Los hidrocarburos saturados son más fáciles de degradar que los insaturados.

Las cadenas simples de hidrocarburos alifáticos insaturados son más fáciles de degradar que las cadenas ramificadas. La introducción de ramificaciones en la molécula de hidrocarburo reduce la biodegradación.

La presencia de enlaces C-C dobles o triples dificulta la degradación.

Las cadenas largas de hidrocarburos alifáticos son más fáciles de degradar que las cadenas cortas. Los hidrocarburos con una longitud de cadena menor a nueve carbonos son difíciles de degradar debido a su toxicidad para los microorganismos.

Los compuestos aromáticos simples se degradan por diferentes aperturas del anillo aromático. La incorporación de halógenos disminuye la degradabilidad por estabilización del anillo aromático.

USEPA (2003), los principales constituyentes derivados del petróleo Dicoetileno, Tetracloroetileno, Tricloetano, Dicloroetano, Diclorobenceno Dicloropropano, Dicloropropeno, Clorofenol, Triclorofenol, Diclorofenol

Triclorobenceno, Diclorobenceno, Dioxano, Acenafteno, Acetona, antraceno, Benceno

La actividad biológica de los microorganismos altera la estructura molecular de los hidrocarburos de petróleo en diversos grados. Cuando la descomposición del compuesto orgánico lleva a la formación de una forma intermedia menos tóxica ocurre una biotransformación. Cuando se logra la descomposición a dióxido de carbono, agua y compuestos celulares se logra la mineralización. Ambas reacciones se producen durante la biodegradación.

**2.3.2.2. Factores del proceso de biorremediación.** Los principales factores que determinan el proceso de degradación son:

#### **Oxígeno (O<sub>2</sub>).**

La disponibilidad de oxígeno es necesaria para la bio-oxidación de los compuestos orgánicos. Las reacciones de oxidación son las de mayor importancia en la biodegradación de los hidrocarburos. Las condiciones aeróbicas se logran mediante el volteo mecánico de los suelos con maquinaria agrícola, evitando de esta manera que se formen zonas saturadas de agua por riego excesivo. El volteo de los suelos no solo introduce oxígeno al suelo sino que además redistribuye los nutrientes, contaminantes y microorganismos, favoreciendo la degradación de los contaminantes. La frecuencia de aireación del suelo dependerá del tipo de suelo y la concentración de contaminantes.

#### **Humedad (H)**

La humedad es necesaria para el crecimiento adecuado de los microorganismos del suelo pero a su vez una excesiva humedad puede reducir la disponibilidad de oxígeno. Durante las operaciones propias de un biorremediación los suelos pueden perder humedad por evaporación por lo que es necesario regar periódicamente las celdas de tratamiento. La USEPA (1995) recomienda mantener la humedad del suelo en el rango de 40% a 85% de la capacidad de campo. Guerrero (1993) señala que es conveniente mantener una humedad del orden del 70% de la capacidad de campo.

## **pH**

Para mantener el crecimiento de los microorganismos degradadores de hidrocarburos, el pH del suelo debe tener valores en el rango de 6 - 8 (USEPA, 2003). Valores de pH mayores a 6,5 minimizan la solubilización y migración de los metales pesados y proveen las condiciones óptimas para la biodegradación. Si los suelos tuvieran valores de pH muy bajos se sugiere emplear cal como material encalante.

## **Temperatura (T)**

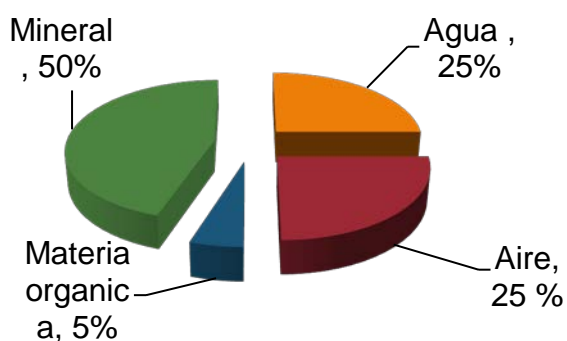
La temperatura tiene una influencia importante en la tasa de degradación de los hidrocarburos, debido a que el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos están en función de la misma. La USEPA (2003) indica que en el rango de 10 a 45°C, la actividad microbiana se duplica cada 10 °C, siendo el rango óptimo para el proceso de biorremediación.

## **Nutrientes**

Los microorganismos requieren de nutrientes inorgánicos como nitrógeno y fósforo para mantener su crecimiento. En general, se recomienda agregar nutrientes usando fertilizantes agrícolas comerciales como urea, nitrato de amonio o superfosfato triple. Dichos compuestos pueden adicionarse en solución junto con el riego o en forma seca incorporándose mediante el volteo de los suelos con la maquinaria agrícola. La dosificación de nitrógeno y fósforo se realiza en función de la concentración de contaminante de acuerdo a una relación que vincula C: N: P y que varía según los autores. La USEPA (2003) sugiere una relación 100:1, 10:1, 1:0,5.

## **Textura del suelo**

Guerrero (2001). La textura del suelo afecta la permeabilidad, el contenido de humedad y la densidad del suelo. Para asegurar que la disponibilidad de oxígeno, la distribución de nutrientes y el contenido de humedad se mantengan en rangos efectivos para la biodegradación es importante conocer la textura, la estructura y composición de los suelos, según el Grafico 02.



Fuente: Tomado de Guerrero – 2011

Grafico 02. Composición volumétrica de un suelo franco.

Según Guerrero (2007), señala que la composición volumétrica de un suelo franco es Mineral (50 %), Agua (25%), Aire (25%), Materia orgánica (5%).

**2.3.2.3. Tasa de bio degradación.** USEPA, (2003). La tasa de biodegradación de los contaminantes dependerá de la estructura química de los mismos. Mientras más compleja es la estructura molecular del contaminante su biodegradación será más lenta.

En general los compuestos alifáticos de bajo peso molecular y los constituyentes monos aromáticos son degradados con mayor facilidad que los compuestos alifáticos de alto peso molecular y poli aromáticos.

De otro lado, cuando la concentración del contaminante es alta se puede producir inhibición del desarrollo microbiano (disminuyendo su capacidad de metabolización) o si es muy alta que intoxique a los microorganismos y estos mueran. Asimismo, esta organización indica que por encima del 30 por ciento se han observado casos donde la velocidad es muy baja pero no nula. Este proceso de degradación se muestra en el grafico. 03.

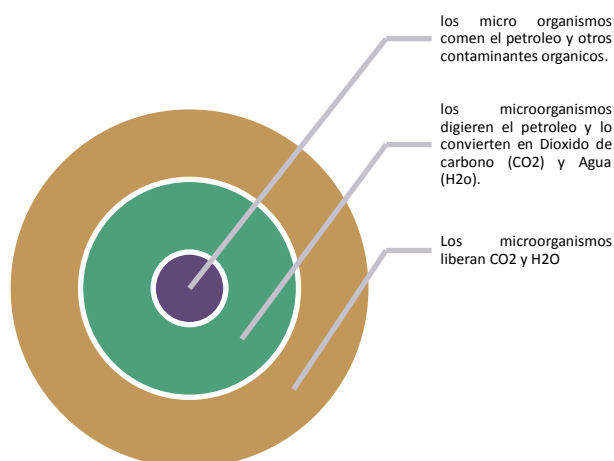


Grafico 03. Proceso de degradación de un hidrocarburo.

En el Cuadro 02. Se resumen los valores óptimos de los principales parámetros para un proyecto de biorremediación de suelos de acuerdo a las experiencias de Pluspetrol – Iquitos: Rio Corrientes (2007).

Cuadro 02. Valores óptimos para el proceso de biorremediación de suelos

ELEMENTO	NIVEL
Agua	40-80 %
pH	5.8-8
Temperatura	18-32 Grados Centígrados
Profundidad	1-2 m por encima del nivel freático

Fuente: Consulta a Pluspetrol (2007)

**2.3.2.4. Especies nativas como reductoras de la concentración de hidrocarburos en suelos.** En áreas muy contaminadas se produce una selección de especies, surgiendo individuos de una misma especies tolerantes a la presencia de contaminantes que incluso, a niveles bajos de contaminación, tienen la capacidad de crecer y reducir las concentraciones de hidrocarburos y otros contaminantes.

En Cuadro 03. Se lista algunas plantas que pueden crecer en suelos con hidrocarburos de petróleo, pero que no presentan necesariamente un crecimiento y desarrollo adecuado, entre las que están el “maíz” *Zea mays*. L.

En el caso de las leguminosas su capacidad de fijar nitrógeno es su principal ventaja.



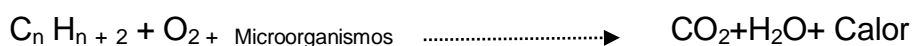
Cuadro 03. Plantas con potencial para reducir la concentración de hidrocarburos en los suelos.

GRUPO DE PLANTAS REDUCTORES			
Nombre común	Nombre científico	Nombre común	Nombre científico
Pasto	<i>Agropyron smithi</i>	Pasto	<i>Cynodon dactylon</i>
Zanahoria	<i>Daucus carota</i>	Trigo	<i>Triticum sp.</i>
Girasol	<i>Heliantus Annus</i>	Guaba	<i>Inga sp</i>
Col	<i>Festuca arundinacea</i>	Maíz	<i>Zea Maíz. L</i>
Soya	<i>Glycine max</i>	Pasto grama	<i>Panicum coloratun</i>

Fuente: Frick et al., 1999

Las plantas que crecen en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo pueden reducir la concentración de estos contaminantes mediante tres mecanismos: degradación, contención o transferencia (Frick *et al.* 1999).

Existe poca evidencia sobre la degradación directa de los hidrocarburos de petróleo por las plantas. La vía de degradación de alcanos en las plantas pueden ser generalizada como:



Donde:

$C_n H_{n+2}$ : Formula General de los alcanos (Hidrocarburos de cadena lineal)

$O_2$ : Oxígeno que proviene del medio ambiente (Proceso aeróbico)

$CO_2 + H_2O$ : Son los productos de la degradación del hidrocarburo (Residual)

Alkorta *et al.* (2001). Concluye que la densidad de bacterias presentes en la rizosfera es dos a cuatro veces mayor que en otras zonas del suelo. La biodegradación en la rizosfera también se estimula por la mayor aireación y contenido de humedad que brindan las raíces, así como, por la liberación de enzimas en los exudados radiculares.

Amakiri et al. (1984) observaron que la germinación de semillas de maíz se retrasó y disminuyó en un 10% después de 16 semanas de permanecer remojadas en crudo de petróleo. Esta misma tendencia fue reportada por Escalante (2000), quien indica además que se observan efectos fitotóxicos en el crecimiento a partir de la concentración de 10% de TPH.

La Rosa, (2000), Los productos finales de ésta degradación dependerán de los tipos de metabolismo y de los grupos fisiológicos que hayan intervenido. Es por ello, que los controles que se puedan ejercer siempre estarán enfocados a favorecer el predominio de determinados metabolismos y en consecuencia a determinados grupos fisiológicos

### **2.3.3. Beneficios del estiércol y aserrín**

Juan Guerrero (2,001), establece que es una forma de materia orgánica de excrementos descompuestos de animales (Vaca, cerdo, ovino, gallina, caballo, aves guaneras, etc.)

Arbaiza et al, (1999). Consideran que el aserrín es una materia orgánica de origen vegetal, derivado del aserrío de especies maderables duras y suaves, como la bolaina, el pino, capirona y otros.

Los beneficios de la materia orgánica de origen animal y vegetal en las plantas son:

- Son fuente de carbono y nitrógeno para los microorganismos.
- Aumento del vigor y crecimiento del tallo y raíces, desde la germinación hasta la emergencia de las plántulas, por su efecto como rizo bacterias promotoras del crecimiento vegetal.
- Genera un mecanismo de supresión de insectos y enfermedades en las plantas, ya que pueden inducir la resistencia sistémica de los cultivos a enfermedades.
- Consume los exudados de raíces, hojas, flores y frutos, evitando la propagación de organismos patógenos y desarrollo de enfermedades.
- Incrementa el crecimiento, calidad y productividad de los cultivos.
- Promueven la floración, fructificación y maduración por sus efectos

hormonales en zonas meristemáticas.

- Incrementa la capacidad fotosintética por medio de un mayor desarrollo foliar y radicular.

Los beneficios de la materia orgánica en los suelos son

Los efectos de los microorganismos en el suelo, están enmarcados en el mejoramiento de las características físicas, biológicas y supresión de enfermedades. Así pues entre sus efectos se pueden mencionar:

*Efectos en las condiciones físicas del suelo:* mejora la estructura y agregación de las partículas del suelo, reduce su compactación, incrementa los espacios porosos y mejora la infiltración del agua.

Controla las poblaciones de microorganismos patógenos que se desarrollan en el suelo por competencia.

Incrementa la biodiversidad microbiana, generando las condiciones necesarias para que los microorganismos benéficos nativos prosperen.

La relación C/N, expresa las unidades de Carbono por unidades de Nitrógeno que contiene un material. Una relación adecuada entre estos dos nutrientes, favorecerá un buen crecimiento y reproducción. La relación C/N óptimo para el inicio de la degradación está comprendida entre 25-35/1, esta relación va bajando hasta llegar a valores cercanos a 10-15/1 y es cuando el material está listo para ser usado.

IMCL, (2004). Considera que la descomposición de la materia orgánica es el resultado de la transformación aeróbica controlada de desechos orgánicos sólidos con el agregado de agua y estimulada por medio de inoculación de microorganismos aeróbicos.

#### **2.3.4. Importancia de los microorganismos en la descomposición de materia orgánica.**

Existen microorganismos en el aire, en el suelo, en nuestros intestinos, en los alimentos que consumimos, en el agua que bebemos. Los microorganismos existentes en la materia orgánica (Estiercol y aserrines) restablece el equilibrio microbiológico del suelo, mejorando sus condiciones físico-químicas, incrementando la reducción de la contaminación del suelo, incrementando la producción de cultivos y su protección. Así mismo aumenta de la velocidad y porcentaje de germinación de las semillas, por su efecto hormonal, similar al del ácido giberélico.

Las bacterias del género *Pseudomonas* spp, son un grupo de microorganismos independientes y autosuficientes.

Las *Pseudomonas* spp, son microorganismos benéficos de origen natural.

Estas bacterias sintetizan sustancias útiles a partir de las secreciones de las raíces, materia orgánica y/o gases nocivos (sulfuro de hidrógeno), usando la luz solar y el calor del suelo como fuentes de energía.

A continuación se describen algunos tipos de microorganismos presentes en la descomposición, según el cuadro 04:

Cuadro 04. Organismos que intervienen en el proceso de descomposición.

Organismo	Sustancia	Literatura.
<i>Pseudomona púdica</i>	n-C6 n-C10	Chakrabarty et al. (1973)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	n-C6 n-C17	Nieder und Shapiro (1975)
<i>Acinetobacter sp</i>	C10-C20	Kennedy und Pinnerty (1975)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	C14	
<i>Pseudomona sol 20</i>	n-C2-C12	Azoulay und Heidemann (1963)
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> SAT	n-C1-C22 Trimethylmethan 2-2-Dhymetil propan 2-Methybutan 2-3 Methylbutan	Ooyama und Foster (1965)
<i>Pseudomona sp/52</i>	naphtalin	Treccani et al (1954)
<i>Escherichia coli</i>	Benz(a)pyrene	Martinsen und Zachariah (1978)
<i>Mycobacterium sp</i>	Piren	Heikamp et al (1988)
<i>Pseudomona butanovora</i>	n-butan	Takahashi (1980)
<i>Morasella species</i>	Benzol	Hogn und Jaenicke (1972)
<i>Pseudomona especies</i>	Benzol	Murray et al (1980)
<i>Pseudomona paucimobilis</i>	Phenantheren	Weissnfels et al (1990)
<i>Pseudomona vesicularis</i>	Fluoren	
<i>Pseudomona putida</i>	Benzol	Gibson et al (1970a)
<i>Pseudomona putida</i>	Toluol	Gibson et al (1970b)

Fuente. Kimura, 2005: Nachgewiesene Metabolisierungen verschiedener als Bodenverunreinigung auftretender Verbindungen

A continuación se presenta, el proceso de descomposición de la materia orgánica:



**Fig. 01.** El proceso de descomposición de la materia orgánica.

Fuente: Adaptación personal -2007

### 2.3.5. Factores que influyen en el proceso de degradación del estiércol y aserrín

El proceso de descomposición de la materia orgánica se basa en la actividad de los microorganismos, para que estos organismos puedan vivir y descomponer la materia orgánica es importante tener en cuenta los principales factores que influyen directamente en la degradación. Siendo los factores más importantes:

a). Determinar las condiciones deseables como el contenido de humedad, concentración de oxígeno, pH, Temperatura y otros. Tal como se muestra en el cuadro 05.

Cuadro 05. Condiciones deseables en el proceso de degradación del estiércol y aserrín

CARACTERISCTICAS	RANGO DESEABLE	RANGO OPTIMO
Relación Carbono/nitrógeno	20:1, 40:1	25:1,30:1
Contenido de Humedad	40-65%	50-60%
Concentración de Oxígeno	Mayor 5%	Mucho mayor al 5%
pH	5.5-9.0	6.5-8.0
Temperatura	45-46	55-60

Fuente: Avendaño 2003.

En lo referente al porcentaje de humedad, Guerrero, (2001). Establece que debe ser alta durante la etapa de descomposición, en la cual prevalecen las bacterias. Si la humedad decae por debajo de 35% la actividad microbiana desciende y el proceso se hace más lento, llegando finalmente a la inhibición. En cuanto a la temperatura Juzcamaita, (2009), La descomposición microbiana libera gran cantidad de energía en forma de calor, lo cual incrementa la temperatura. Es necesario mantener una temperatura del proceso en el rango adecuado (40°C-60°C), por ello es importante la aireación.

En cuanto al oxígeno Guerrero, (1993). Señala, que el oxígeno, además de ser necesario para la respiración de los microorganismos y el metabolismo aerobio, actúa como oxidante de las especies químicas orgánicas o

inorgánicas presentes en el sustrato. Se necesita como mínimo una concentración de 5% de O<sub>2</sub> para que el proceso no se detenga.

Ocampo et al, (2002). La aireación es necesaria pero debe ser controlada, debido a que si ésta es excesiva, puede provocar un enfriamiento de la mezcla de residuos, y por ende una disminución en la actividad metabólica de los microorganismos. La aireación libera calor, vapor de agua y otros gases que se encuentran al interior de la pila, además incorpora O<sub>2</sub>.

En lo referente al pH, Ocampo; et al, (2002), mencionan; el pH influye en el proceso de la descomposición de la materia orgánica a causa de su acción sobre los microorganismos.

- En general, los hongos toleran un amplio margen de pH, que va desde 5 hasta 8.
- El rango de pH tolerado por las bacterias en general es relativamente amplio, existen grupos fisiológicos adaptados a valores extremos.
- No obstante un pH cercano al neutro (6.5 –7.5) asegura el desarrollo favorable de la gran mayoría de los grupos fisiológicos.
- El pH es importante cuando se utiliza materiales ricos en nitrógeno, ya que un pH mayor a 8.5 promueve la conversión del nitrógeno en amonio y puede perderse en el ambiente en forma de amoniaco.

b). Tener en cuenta la relación carbono / nitrógeno del estiércol y el aserrín.

Los microorganismos involucrados en el proceso de degradación requieren nutrientes primarios como carbono, nitrógeno, fósforo, y potasio. El carbono es utilizado como fuente de energía para su crecimiento, mientras que el nitrógeno es indispensable para la síntesis de proteínas y la reproducción de los microorganismos. La relación C/N óptimo para el inicio del proceso de degradación de la materia orgánica debe estar comprendido entre 25-35/1, (APROLAB, 2007). Relaciones de C/N menores a 20:1 utilizarán todo el carbono sin haber estabilizado el nitrógeno presente, esto provoca que el nitrógeno se pierda en forma amoniacal, provocando malos olores y la degradación resultante será de menor calidad. En el cuadro 05 y 06, se presenta las principales características del estiércol y aserrín orgánico. Y

Composición química y relación de C/N de los aserrines utilizados en el bioensayo.

Cuadro 06. Principales características de diferentes estiércoles orgánicos

<b>Estiércol</b>	<b>% N</b>	<b>C/N</b>
Va caza	1.5 a 4.2	11 a 30/1
Cerdaza	1.9 a 4.3	9 a 19/1

Fuente: Avendaño 2003

Cuadro 07. Composición química y relación carbono-nitrógeno de los aserrines utilizados en el bioensayo.

<b>Especies</b>	<b>Extractivos en Alcohol benceno</b>	<b>Celulosa</b>	<b>Sílice</b>	<b>Hemicelulosa</b>	<b>C/N</b>
Pino	7.44	46.11	0.21	19.18	270.5
Capirona	2.2	59.7	0.14	18.7	206.0
Bolaina	4.77	50.03	0.20	0.25	240.0

Fuente: Estudio Madera con fines industriales, Madre de Dios, 1984

Un aserrín que presente una relación C/N superior a 40 requerirá para su biodegradación un mayor número de generaciones de microorganismos y un mayor tiempo para alcanzar una relación apropiada para su uso agronómico. Si el material del que se dispone no presenta una relación C/N apropiada, se debe proceder a realizar una mezcla con otros materiales, este procedimiento es conocido como balance de nutrientes (Kimura, 2005).



## CAPITULO 3: METODOLOGÍA

### 3.1. Hipótesis

Se reducirá la contaminación de suelos contaminados con hidrocarburos (TPH) mediante la técnica de biorremediación, aplicando estiércol orgánico más aserrines, utilizando como planta indicadora al maíz.

### 3.2. Variable dependiente (V.D)

Suelo contaminado con hidrocarburos TPH

### 3.3. Variable independiente (V.I)

Biorremediación a base de estiércol y aserrín tomando como indicador la planta de maíz. (Altura de planta, peso seco foliar, peso seco radicular)

### 3.4. Tipo y diseño de la investigación.

El tipo de investigación es experimental y el diseño es el modelo: Diseño Completamente al Azar (DCA), distribuido en 3 bloques, con 12 tratamientos, haciendo un total de 36 unidades experimentales, cuyo modelo matemático es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + e_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Observación realizada en el i-ésimo maceta en la repetición j-ésima

$\mu$  = Es la media general

$T_i$  = Denota el efecto del i-ésimo tratamiento

$\beta_j$  = Denota el efecto del j-ésimo bloque; y

$e_{ij}$  = Denota el efecto aleatorio del error asociado a la observación  $y_{ij}$

### 3.5. Materiales y equipos utilizados en el experimento

#### 3.5.1. Materiales

Para el desarrollo del bioensayo en campo se emplearon los siguientes materiales:

- 01 Lampa
- 01 manta de polipropileno de 50 kg.y esparcimiento de la muestra.
- 01 plumón marcador.
- 01 tamiz granulométrico

Mientras que para la colecta de muestras que se analizarán en laboratorios

- Bolsas ziplock de 1000 gr. (02)
- Baldes (02)
- Plumón marcador
- Etiquetas para codificación de muestras

Para el acondicionamiento del sustrato

- Bandejas de plástico de 10 litros (02).
- Balanza de 0,1 gramo de precisión.
- 36 bolsas de aserrines (Bolaina, Capirona, Pino)

Para la instalación del bioensayo

- Semillas de Zea mays L. (variedad Marginal T-28)
- Guantes de jebe
- Casco, protectores nasales
- 36 bolsas excretas ( Vacaza, Cerdaza)
- 01 bandeja para preparación de prueba de germinación
- Etiquetas para identificar tratamientos
- Agua para riego
- Muestras de suelo contaminados por hidrocarburo con igual concentración de TPH.
- Muestra de suelo puro contaminado con TPH

Para la medición de la altura de las plantas

- Calibrador de Vernier de 20 centímetros. la medición de la materia seca foliar y radicular
- Bolsas de papel
- Pinzas
- Sobres de manila

### **3.3.2. Equipos**

Para el desarrollo del experimento en campo se emplearon los siguientes equipos:

- 01 Estufa
- Computadora con Software SAS (Statistical Analysis System), para el análisis estadístico.

### **3.6. Descripción del experimento**

Concluido el periodo del bioensayo se evaluaron la altura de planta (cm), peso seco foliar (gr), y peso seco radicular. (gr)

Las variaciones de los parámetros de crecimiento en relación con las diferentes concentraciones de TPH de los suelos, se evaluaron estadísticamente con el Diseño Completo al Azar “<sup>7</sup>DCA” conformado por doce tratamientos con tres repeticiones c/u. respectivamente. Los procedimientos metodológicos para el bio ensayo fueron las siguientes:

### **3.7. Ubicación**

El área materia de estudio se encuentra localizado en el complejo industrial de la Refinería la Pampilla, Ubicado en el Distrito de Ventanilla, provincia constitucional del Callao. La cual se aprecia en la fig. 02.

---

<sup>7</sup> EL Diseño Completamente al Azar, “DCA” es el diseño experimental, que por sus características peculiares es el que mejor se comporta en campo para la evaluación de parámetros de biorremediación en suelos.

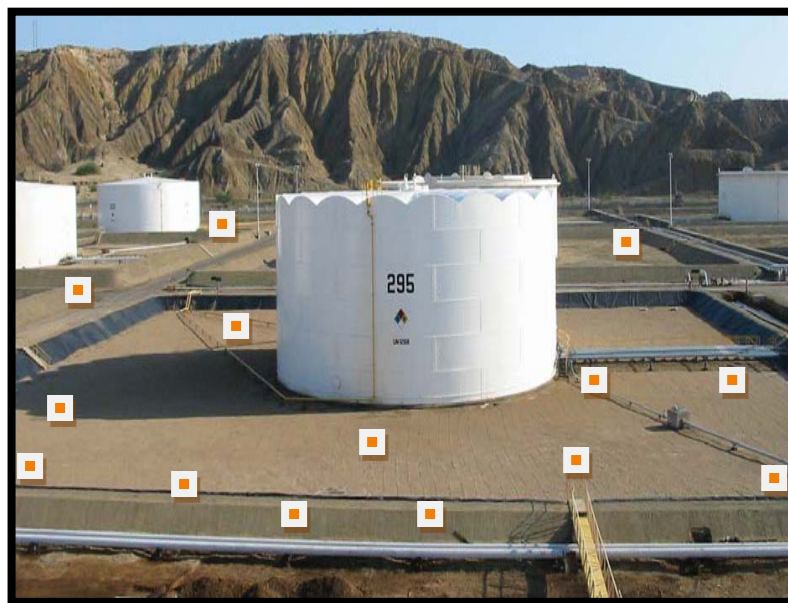
Lote de Petroperú  
Ref. Pampilla  
(Toma de Muestras de  
suelos contaminados)



Fig. 02. Mapa del complejo de almacenamiento de petróleo de la Refinería la Pampilla.

### 3.8. Muestreo de suelos:

Alrededor de los tanques de almacenamiento de petróleo en la Refinería la Pampilla, se tomaron las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos, utilizando una pala plana, limpiando previamente la capa superficial se extrajeron las muestras en forma de "V" y en Zigzag, depositando las muestras en una manta de polietileno para su homogenización. Tal como se aprecia en la figura 03.



■ Muestreo de suelos de los alrededores del tanque

Fig. 03. Área de recolección de muestras de suelos contaminados con hidrocarburos.

Luego la muestra compuesta se llevo al Laboratorio de Fertilidad de Suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria. Donde se procedió a secar a temperatura ambiente por 48 horas. Luego se efectuó el tamizado con una malla para obtener tamaños menores de 2mm. Y luego se prepara los tratamientos de acuerdo al Diseño Completamente al Azar (DCA), para luego efectuar el análisis de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) en el Laboratorio de Envirolab. Una muestra de suelo contaminado con hidrocarburos se efectuó el análisis de la caracterización físico-químico en el laboratorio de fertilidad de la Universidad Agraria la Molina.

También se saco muestras de un suelo normal sin contaminación de hidrocarburos, de un área cercana a los tanques de almacenamiento de la Refinería la Pampilla. Y dichas muestras se llevo al Laboratorio de Fertilidad de Suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria, para el análisis de caracterización físico-químico.

Es importante mencionar que los aserrines de bolaina, pino y capirona se adquirieron del Parque Industrial de Villa el Salvador el estiércol de vacaza y cerdaza se colectaron del campus de la Universidad Agraria la Molina, tal como se aprecia en la fig. 04.



Fig. 04. Recojo de estiércol para el experimento.

### 3.9. Distribución del diseño experimental (DCA)

Para el presente trabajo de investigación, se uso el diseño completamente al azar, con 12 tratamientos y 3 repeticiones, utilizando macetas experimentales con capacidad de 1 kg.

La dosificación por maceta fue 150 gr de aserrín 150 gr estiércol orgánico, y 700 gr de suelo contaminado, para lo cual se utilizo estiércol de vacaza, estiércol de cerdaza, aserrín de bolaina, aserrín de capirona y aserrín de pino, los cuales se distribuyeron en 36 unidades. Según se aprecia en la figura 05 y 06.



Fig. 05. Preparación de los tratamientos del experimento.

Diseño Completamente al Azar  
(ANVA)

FV	GL
Tratamiento (t -1)	11
Error	24
Total (total u.e -1)	35

**Dosificación por maceta**

aserrin	150 gr
estiercol	150 gr
suelo contaminado	700 gr
<b>Total</b>	<b>1000 gr</b>

**Leyenda**

- B: Aserrin de bolaina
- C: Cerdaza
- V: Vacaza
- Cap: Capirona
- P: Pino
- SC: Suelo contaminado

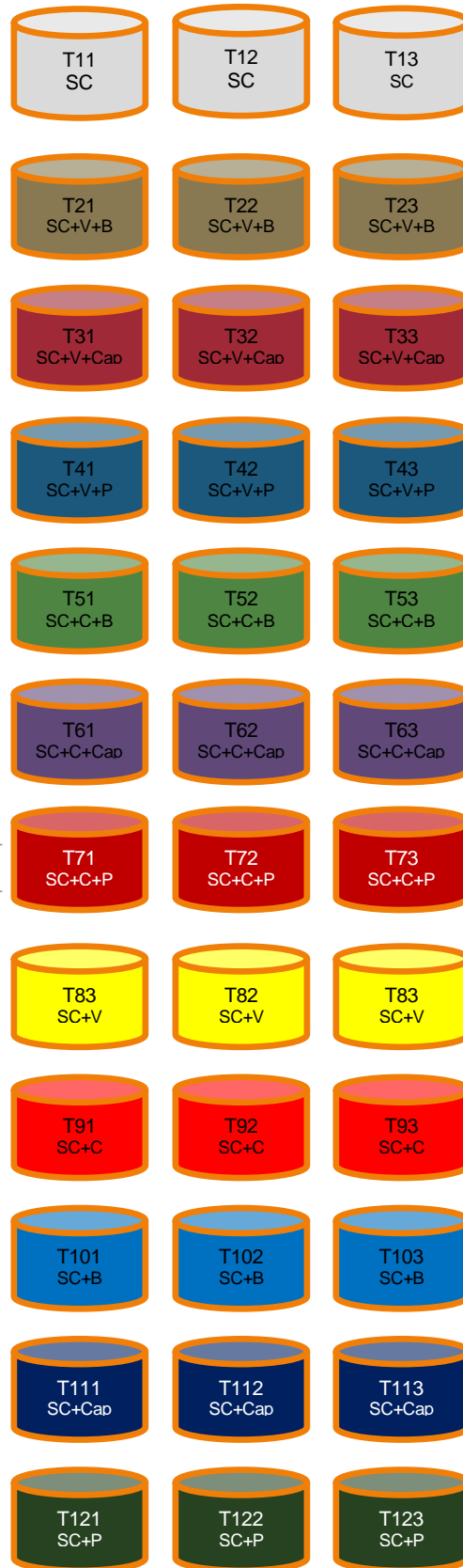


Figura 06. Distribución de tratamientos de acuerdo al Diseño Completamente al Azar.



### 3.9. Dosificación de los tratamientos

De acuerdo a la dosificación de los tratamientos en el Diseño Completamente al Azar, se procedió a preparar las muestras respectivas en bolsas Ziplock de 1000 gr. para el análisis de la concentración del TPH en el laboratorio de Envirolab. Cuyo resultado se presenta en cuadro 08.

Cuadro 08. Presentación de tratamientos

<b>Tratamiento</b>	<b>Composición</b>
T1	SC
T2	SC+V+Cap.
T3	SC+V+B
T4	SC+V+P
T5	SC+C+B
T6	SC+C+Cap
T7	SC+C+P
T8	SC+V
T9	SC+C
T10	SC+B
T11	SC+Cap.
T12	SC+P

De la misma manera el suelo normal y el suelo contaminado, se procedió a preparar la muestra en bolsas Ziplock de 1000 gr. para su respectivo análisis de suelo (Caracterización físico-químico) la cual se efectuó en el laboratorio de análisis de suelos, plantas, aguas y fertilizantes del departamento de suelos de la Universidad Agraria la Molina.

### 3.10. Instalación del experimento

La instalación del experimento se realizó en el Taller de Fertilidad de suelos de la Facultad de agronomía de la Universidad Agraria la Molina, ubicado en el Distrito de la Molina, provincia de Lima. Según se aprecia en la figura 07.

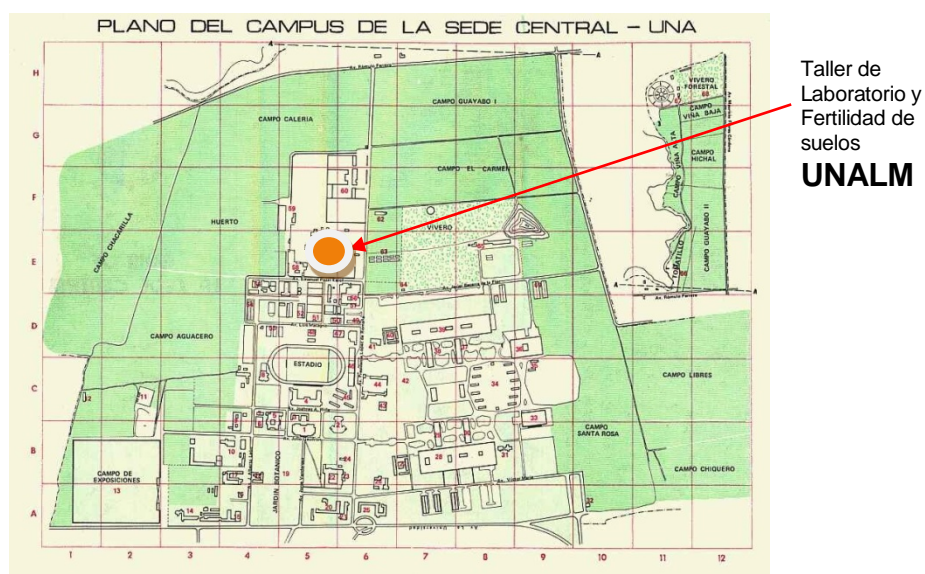


Fig. 07. Plano de ubicación del Taller de Fertilidad de Suelos – UNALM.

Para la instalación de experimento se procedió a la dosificación de los 12 tratamientos. Tal como se muestra en cuadro 09.

Cuadro 09. Combinaciones de los tratamientos del experimento

TRATAMIENTOS	COMBINACIONES	REPETICIONES
T1	<sup>8</sup> SC	3
T2	SC+ <sup>9</sup> V+Cap.	3
T3	SC+V+ <sup>10</sup> B	3
T4	SC+V+P	3
T5	SC+ <sup>11</sup> C+B	3
T6	SC+C+ <sup>12</sup> Cap	3
T7	SC+C+ <sup>13</sup> P	3
T8	SC+V	3
T9	SC+C	3
T10	SC+B	3
T11	SC+Cap.	3
T12	SC+P	3
Total		36 unidades experimentales

<sup>8</sup> (SC) Suelo contaminado por hidrocarburos

<sup>9</sup> (V) Vacaza,

<sup>10</sup> (B) Aserrín de bolaina

<sup>11</sup> © Cerdaza

<sup>12</sup> (Cap) Capirona

<sup>13</sup> (P) Pino

Como planta indicadora se utilizó el maíz, *Zea mays.L*, por ser una planta tolerante a los hidrocarburos de petróleo y sales (Chayneau, et al 2000).

Antes de proceder a la siembra del maíz en las respectivas macetas se procedió a realizar la prueba de poder germinativo al 100 %, dando un resultado 99% de poder germinativa en placas petric, colocando sobre un papel humectante entre 8 a 10 semillas de maíz. Tal como se aprecia en la figura 06.



Fig. 08. Prueba de viabilidad de la semilla de maíz.

Luego se procedió sembrar en las macetas a una profundidad de 02 cm de profundidad. Con los tratamientos a razón de 5 semillas/maceta. Obteniéndose un 95% de poder germinativo, quedando instalado el experimento, lo cual podemos apreciar en la Fig.09.



Fig. 09. Instalación del experimento con los tratamientos

Durante el periodo que duró experimento, para la germinación y crecimiento del maíz se procedió a regar con agua de pozo, manteniendo su capacidad de campo hasta el término del experimento, para lo cual se controló el riego cada dos días, según podemos apreciar en la fig. 10, 11, 12, 13, y 14 respectivamente.



Fig. 10. Riego de plantas de maíz bajo condiciones naturales



Fig. 11. Crecimiento de la planta de maíz a los 15 días, bajo condiciones naturales.

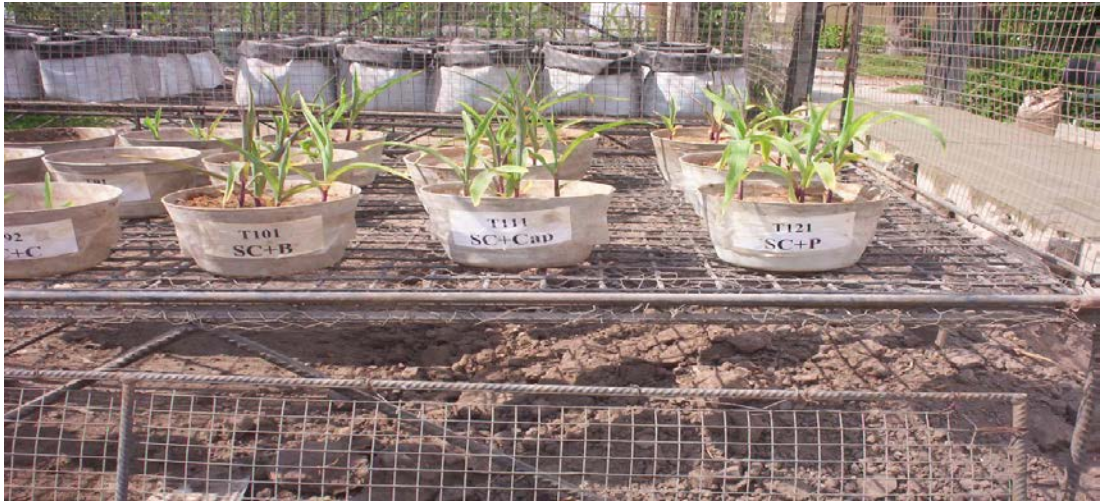


Fig. 12. Crecimiento de la planta de maíz a los 25 días, bajo condiciones naturales.



Fig. 13. Crecimiento de la planta de maíz a los 35 días, bajo condiciones naturales

### 3.11. Estimadores estadísticos

Para el análisis estadístico se hizo uso Software Software SAS (Statistical Analysis System), Se incluye el cálculo de los siguientes estimadores estadísticos:

**Media aritmética (X):** valor medio de los resultados obtenidos al analizar tres repeticiones:

$$X = \Sigma X/n$$

**Desviación estándar (S):** medida de la dispersión de los valores ensayados respecto al valor promedio calculado (media):

$$S = \sqrt{\frac{\sum X^2 - (\sum X)^2}{n(n-1)}}$$

**Coefficiente de variación (CV):** cálculo porcentual de la desviación estándar:

$$CV (\%) = (S/X) * 100$$

Uso de Tukey, se realizó la prueba estadística de <sup>14</sup>Tukey para un nivel de significación (P) del 95%.

### 3.12. Medición de las variables de la planta de maíz

A los 60 días que terminó el experimento se procedió a medir, La altura de planta de maíz, desde la base del tallo hasta el ápice de la hoja más larga.

Así mismo se determinó el peso seco foliar, para lo cual se colectaron las hojas y tallos, llevándose a una estufa a 60 grados centígrados por tres días en bolsas de papel debidamente rotuladas, para determinar el peso seco foliar (hojas y tallos) de cada uno de los tratamientos, mediante una balanza de precisión analítica.

De igual manera se determinó el peso seco radicular, por lo cual se procedió a extraer las raíces, utilizando con pinzas de cada tratamiento y se limpiaron con abundante agua en un colador, para secarlos en una estufa a 60 grados

---

<sup>14</sup> Esta prueba compara pares de medias y permite identificar si existen diferencias significativas entre las medias de dos tratamientos. En los cuadros de la sección Resultados y Métodos las letras minúsculas (en forma de superíndices) indican los resultados de la prueba de Tukey. Si dichos superíndices son distintos en una misma columna, los valores correspondientes serán estadísticamente diferentes entre sí a un nivel de significación.

centígrados por tres días en bolsas de papel debidamente rotuladas, y finalmente obtener el peso seco radicular, utilizando la balanza de precisión.

### **3.13. Preparación de muestras de los tratamientos para el análisis suelos**

Concluido el experimento se procedió a preparar las muestras de cada tratamiento para determinar el nivel de concentraciones de hidrocarburos totales de petróleo (TPH)



## CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados

#### 4.1.1. Análisis inicial de la concentración de TPH

De acuerdo a la dosificación de los tratamientos en el Diseño Completamente al Azar, los resultados del análisis en laboratorio Envirolab, se presenta en el cuadro 10.

Cuadro 10. Resultados de la concentración inicial de TPH por tratamiento.

Tratamiento	Composición	gr de TPH/kg de suelo
T1	SC	21.81
T2	SC+V+Cap.	19.90
<b>T3</b>	<b>SC+V+B</b>	<b>19.85</b>
T4	SC+V+P	19.80
T5	SC+C+B	19.87
T6	SC+C+Cap	20.80
T7	SC+C+P	20.25
T8	SC+V	20.60
T9	SC+C	20.70
T10	SC+B	20.90
T11	SC+Cap.	21.20
T12	SC+P	21.10

Fuente: Lab. Envirolab-2007

De los resultados del análisis inicial de laboratorio, se aprecia que el Tratamiento T1, (suelo contaminado), tuvo una concentración de 21.81 gr de TPH por Kg de suelo. Mientras que los tratamientos que han recibido una dosificación con estiércol más aserrín tuvieron una reducción ligera en comparación a los tratamientos de los suelos contaminados solo con estiércol y solo con aserrín. Debido a la exposición al sol, produciéndose la aireación y evaporación de los hidrocarburos de petróleo. A respecto Ocampo, et al. 2002, considera importante la aireación por que libera calor, vapor de agua y otros gases que se encuentran en el interior del suelo; además de incorporar oxígeno.

#### 4.1.2. Análisis inicial de las propiedades físicas y químicas del suelo contaminado.

Cuadro. 11. Análisis inicial de las propiedades físicas y químicas del suelo contaminado.

Propiedades	Unidades	Valores	Interpretacion
Clase textural	--	Franco	Textura media
pH 1:1	--	5.88	Moderadamente acido
C. E.	dS/m	19.1	Fuertemente salino
CaCO <sub>3</sub>	%	0	Bajo
M. O.	-	9.7	Alto
P disponible	mg/Kg	5.8	Alto
K disponible	mg/kg	585	Alto
CIC total	Meq/100	11.84	Medio
Saturación de	%	76	Alto
Fe	mg/Kg	100	Alto
Zn	mg/Kg	481	Alto
Cu	mg/Kg	5.9	

Fuente: Laboratorio de análisis de suelos, plantas, aguas y fertilizantes de la UNALM-2007

De acuerdo al cuadro 11. Se aprecia que el suelo tiene una buena fertilidad y buenas características físicas y químicas y una alta concentración de micro elementos (Fe, Cu, Zn ), así mismo presenta una alta concentración de materia orgánica debido a que existe una alta concentración de hidrocarburos, lo que concuerda por lo manifestado por Martinez et al 2001.

#### 4.1.3. Análisis de la altura de la planta de maíz

Como resultado del experimento de acuerdo al Modelo de Diseño Completamente al Azar, se procedió a medir la altura de planta de maíz. La cual se presente en el cuadro 12.

Cuadro 12. Promedio de altura de planta (cm) de maíz para los 12 tratamientos evaluados.

Tratamiento	Repetición (Promedio/Maceta)			Promedio
	R1	R2	R3	
T1	5.33	5.45	5.25	5.34
T2	37.29	26.38	32.60	32.09
T3	48.32	51.00	50.00	49.77
T4	39.42	50.83	35.38	41.88
T5	31.58	33.45	31.32	32.12
T6	34.28	47.87	42.67	41.61
T7	26.98	17.00	26.09	23.36
T8	21.09	27.00	24.09	24.06
T9	24.42	25.87	24.42	24.90
T10	20.89	23.37	19.87	21.38
T11	21.55	22.55	22.45	22.18
T12	23.55	21.55	23.45	22.85

Según el análisis del promedio de altura de planta (cm), que se aprecia en el cuadro 12. El T3 (suelo contaminado, más vacaza, más aserrín de bolaina) tuvo un mayor crecimiento (49.77cm), superior a los demás tratamientos. Lo cual se presenta en el grafico 04.

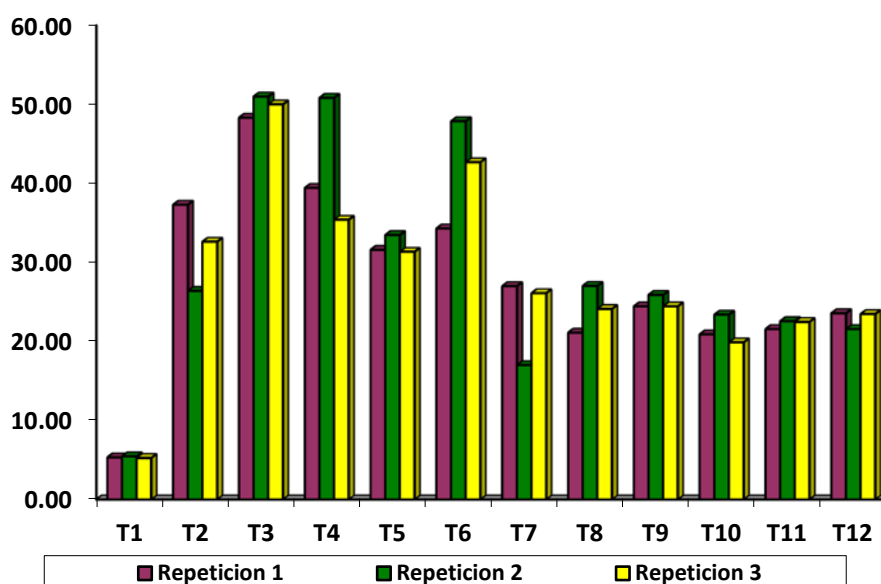


Grafico 04. Altura promedio de planta (cm)

**4.1.3.1. Interpretación de altura de planta.** Según la prueba de Tuckey, los resultados del análisis estadístico se muestran en el cuadro 13.

Cuadro 13. Prueba de Tuckey de los datos de altura de planta de maíz para los 12 tratamientos evaluados.

Tratamiento	gr TPH/Kg de suelo	Altura de planta		
		Promedio	S	CV (%)
T1	21.81	5.34	0.10	1.89
T2	19.90	32.09	5.47	17.06
<b>T3</b>	<b>19.85</b>	<b>49.77</b>	<b>1.35</b>	<b>2.72</b>
T4	19.80	41.88	8.01	19.13
T5	19.87	32.12	1.16	3.62
T6	20.80	41.61	6.86	16.48
T7	20.25	23.36	5.52	23.65
T8	20.60	24.06	2.96	12.28
T9	20.70	24.90	0.84	3.36
T10	20.90	21.38	1.80	8.42
T11	21.20	22.18	0.55	2.48
T12	21.10	22.85	1.13	4.93
ANVA				9.67
Tratamiento	F		P	
	26.77		0.0001 **	

En el cuadro 13. La prueba de estadística de Tuckey indica que en la variable altura de planta, los tratamientos T3, T4 y T6, resultaron significativos en comparación a los demás tratamientos; sin embargo comparando el T3 con T4 y T6, resulta que el T3 es altamente significativo, con un coeficiente de variación de 2.72%. Obtenida del cociente de la desviación estandar (1.35) entre la media (49.77) multiplicada por 100.

**4.1.3.2. Discusión sobre altura de planta.** Cabe destacar que un buen parámetro para evaluar los niveles de concentración de hidrocarburos en suelos contaminados es la altura de planta, dado que el estiércol de vaca y el aserrín de bolaina permitieron obtener un mejor crecimiento de las plantas de maíz en 49.77 cm en promedio, por lo que tuvo efectos altamente significativos. Lo cual coincide con Manrique et al (1988). Que establece que el efecto en la emergencia y crecimiento de diez variedades de maíz en un suelo contaminado con tres concentraciones de petróleo crudo. Los

resultados indicaron que los tipos de maíz comparados tuvieron una respuesta diferencial en emergencia y crecimiento de las plantas en las distintas concentraciones de petróleo en el suelo. No obstante, se observó que los suelos con una concentración de 25,000 mg/Kg de suelo con hidrocarburos permitieron el crecimiento y desarrollo de todas las variedades de maíz. De igual manera Escalante (2000) reporta la reducción de la altura en *Zea mays. L.*, se produce cuando se aumenta la concentración de TPH en los suelos. Así mismo Bailey (1999); reporta un escaso crecimiento de plantas de trigo en suelos contaminados con hidrocarburos. El autor también señala que especies como *Lespedeza sericea* y *Medicago sativa* no sobreviven a la exposición a suelos con petróleo con concentraciones mayores a 5000 mg de TPH/kg de suelo.

#### 4.1.4. Análisis del peso seco foliar de la planta de maíz.

Como resultado del experimento de acuerdo al modelo de diseño completamente al azar, se procedió a medir el peso seco foliar. La cual se presente en el cuadro 14.

Cuadro 14. Promedio del peso seco foliar (gr) para los 12 tratamientos evaluados

Tratamiento	Repetición (Promedio/Maceta)			Promedio gr.
	1	2	3	
<b>T1</b>	2.32	2.34	2.94	2.53
<b>T2</b>	6.12	5.99	5.97	6.03
<b>T3</b>	8.87	8.39	8.76	8.67
<b>T4</b>	5.90	6.43	7.89	6.74
<b>T5</b>	6.90	5.13	5.62	5.88
<b>T6</b>	7.02	5.39	5.28	5.90
<b>T7</b>	5.49	5.40	5.09	5.32
<b>T8</b>	5.67	5.20	7.12	6.00
<b>T9</b>	4.98	4.38	6.79	5.38
<b>T10</b>	5.10	5.12	4.96	5.06
<b>T11</b>	4.89	4.19	4.90	4.66
<b>T12</b>	4.890	4.190	4.900	4.66

El análisis de promedios del peso seco foliar (gr), que se aprecia en el cuadro 14. El Tratamiento T3 (suelo contaminado, más vacaza, más aserrín de

bolaina) obtuvo el mayor peso seco foliar/maceta equivalente 8.67 gr. superior a todos los demás tratamientos. Lo cual se presenta en el grafico 05.

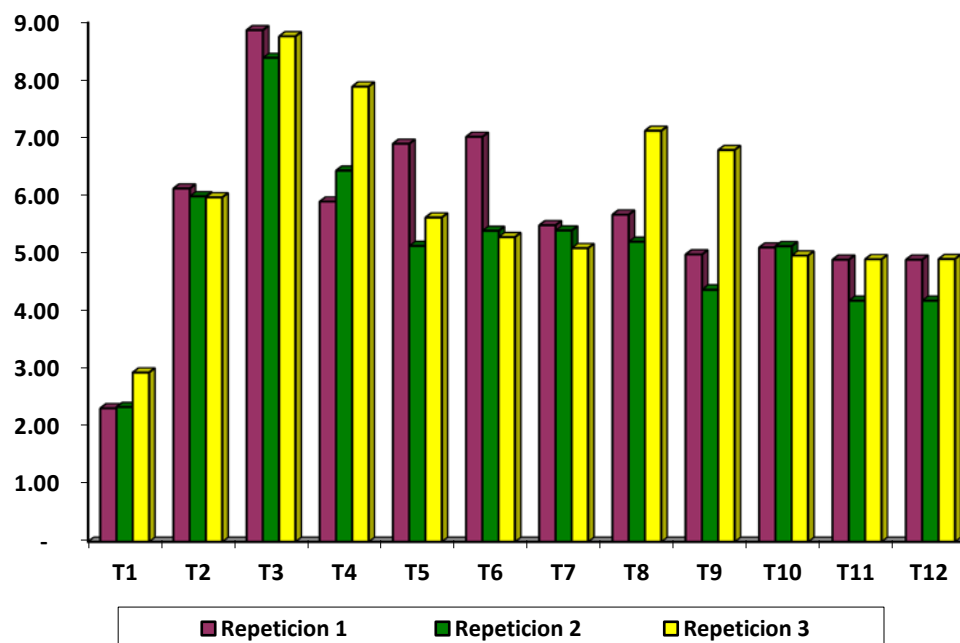


Grafico 05. Peso seco foliar por repeticiones (gr)

**4.1.4.1. Interpretación del peso seco foliar (gr).** Según la prueba de Tuckey, los resultados del análisis estadístico se muestran en el cuadro 15. Cuadro 15. Prueba de Tuckey de los datos de peso seco foliar de planta de maíz para los 12 tratamientos evaluados.

Tratamiento	gr TPH/kg suelo	Peso Seco Foliar (gr)		
		Promedio	S	CV (%)
T1	21.81	2.53	0.35	13.92
T2	19.90	6.03	0.08	1.39
T3	19.85	8.67 **	0.25	2.91
T4	19.80	6.74	1.03	15.30
T5	19.87	5.88	0.91	15.54
T6	20.80	5.90	0.97	16.52
T7	20.25	5.32	0.21	3.90
T8	20.60	6.00	1.00	16.71
T9	20.70	5.38	1.26	23.34
T10	20.90	5.06	0.09	1.74
T11	21.20	4.66	0.41	8.73
T12	21.10	4.66	0.41	8.74
ANVA				<b>10.73</b>
Tratamiento		F	P	
		12.42	0.0001 **	

En el cuadro 15. La prueba estadística de Tuckey indica que en la variable peso seco foliar, el tratamiento T3, presenta una alta significación estadística resultando mejor que todos los tratamientos, con un coeficiente de variación de 2.91%. Obtenida del cociente de la desviación estándar (0.25) entre la media (8.67) multiplicada por 100.

**4.1.4.2. Discusión sobre peso seco foliar.** Se observó que las hojas presentaron deficiencias fisiológicas en el color, teniendo (Clorosis), el mismo que se atribuye a la concentración de hidrocarburos en el suelo. Sin embargo Wilse et al. (1998) citado por Frick et al. (1999) reporta quemaduras en las hojas de plantas de alfalfa, que crecieron en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo.

#### 4.1.5. Análisis del peso seco radicular de la planta de maíz.

Como resultado del experimento de acuerdo al modelo de Diseño Completamente al Azar, se procedió a medir el parámetro peso seco radicular, el mismo que se presenta en el cuadro 16.

Cuadro 16. Promedio del peso seco radicular de la planta (gr) de maíz para los 12 tratamientos

Tratamiento	Repetición (Promedio/Maceta)			Promedio
	1	2	3	
<b>T1</b>	2.43	2.86	2.82	2.70
<b>T2</b>	4.32	3.89	3.99	4.07
<b>T3</b>	6.29	7.56	6.34	6.73
<b>T4</b>	3.49	4.56	5.32	4.46
<b>T5</b>	4.32	3.34	3.38	3.68
<b>T6</b>	5.09	4.89	4.43	4.80
<b>T7</b>	3.45	3.42	3.04	3.30
<b>T8</b>	3.11	3.26	3.74	3.37
<b>T9</b>	2.35	3.31	4.56	3.41
<b>T10</b>	4.34	4.67	3.65	4.22
<b>T11</b>	4.56	4.31	4.42	4.43
<b>T12</b>	3.56	3.61	3.42	3.53

De acuerdo al análisis de promedios de peso seco radicular (gr), que se aprecia en el cuadro 16. El T3 (suelo contaminado, más vacaza, más aserrín de bolaina) obtuvo el mayor peso seco radicular del maíz, equivalente 6.73 gr.

Resultando mejor que los otros tratamientos, la cual se presenta en el grafico 06.

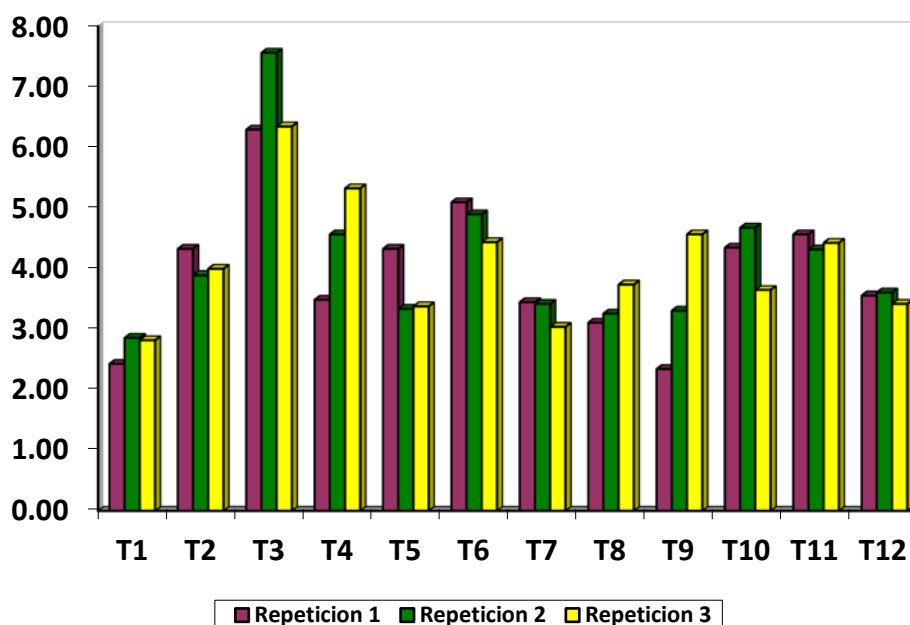


Grafico 06. Peso seco radicular por repeticiones (gr)

**4.1.5.1. Interpretación del peso seco radicular.** Según la prueba de Tuckey, los resultados del análisis estadístico se muestran en el cuadro 17. Cuadro 17. Prueba de Tuckey de los datos del peso seco radicular (gr) de la planta de maíz para los 12 tratamientos evaluados.

Tratamiento	gr TPH/kg suelo	Peso Seco Radicular (gr)		
		Promedio	S	CV (%)
T1	21.81	2.70	0.24	8.79
T2	19.90	4.07	0.23	5.53
T3	19.85	6.73 **	0.72	10.68
T4	19.80	4.46	0.92	20.63
T5	19.87	3.68	0.55	15.07
T6	20.80	4.80	0.34	7.05
T7	20.25	3.30	0.23	6.90
T8	20.60	3.37	0.33	9.77
T9	20.70	3.41	1.11	32.62
T10	20.90	4.22	0.52	12.33
T11	21.20	4.43	0.13	2.83
T12	21.10	4.66	0.41	8.74
		ANVA		<b>11.74</b>
Tratamiento		F	P	
		10.74	0.0001 **	



Según el cuadro 17. La prueba de Tukey nos indica que para la variable peso seco radicular, el tratamiento T3, estadísticamente es altamente significativo, con un coeficiente de variación de 10.68%. Obtenida del cociente de la desviación estándar (0.72) entre la media (6.73) multiplicada por 100.

**4.1.5.2. Discusión sobre el peso seco radicular.** Según Manrique, et al. (1988). La planta de maíz presenta un sistema radicular fibroso, su mayor área radicular es superficial y está localizada alrededor de unos 30 cm de profundidad, en un radio de 40 cm. Uno de los mecanismos sugeridos para la degradación de hidrocarburos de petróleo por las plantas es la “rizo degradación”. Gunther et al. (1996) referido por Frick (1999) sugiere que las raíces de las plantas estimulan la degradación microbiana de los hidrocarburos en suelos contaminados con estos compuestos. La base de datos de plantas con potencial para remediar suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo incluye al maíz y otras gramíneas en su lista de especies. Así mismo Alcorta et, al 2001, reporta que existe mayor densidad de bacterias en la parte de la rizosfera de las plantas entre dos a cuatro veces mayor que en otras zonas del suelo.

#### 4.1.6. Análisis final de la concentración de TPH en los tratamientos

De acuerdo a la dosificación de los tratamientos en el Diseño Completamente al Azar, los resultados del análisis final se presentan en el cuadro 18.

Cuadro 18. Resultado de la concentración final de TPH por tratamiento

Tratamiento	Composición	gr de TPH/kg de suelo
T1	SC	21.37
T2	SC+V+Cap.	16.92
T3	SC+V+B	16.28
T4	SC+V+P	16.63
T5	SC+C+B	16.59
T6	SC+C+Cap	17.89
T7	SC+C+P	17.01
T8	SC+V	18.15
T9	SC+C	18.42
T10	SC+B	19.23
T11	SC+Cap.	20.14
T12	SC+P	19.83

En el cuadro 18, se aprecia que los tratamientos con estiércol orgánico mas aserrín han reducido considerablemente las concentraciones de hidrocarburos en comparación con los tratamientos compuestos solo por estiércol o solo por aserrín.

#### 4.2. Resultados finales

Se presenta los resultados de las concentraciones de hidrocarburos en los tratamientos y su relación con las variables altura de planta, peso seco foliar y peso seco radicular. Según el cuadro 19.

Cuadro 19. Concentración de hidrocarburos por tratamiento y promedios de altura de planta, peso seco foliar y peso seco radicular.

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN (gr TPH/kg de suelo)	ALTURA DE PLANTA (cm)	PESO SECO FOLIAR (gr)	PESO SECO RADICULAR (gr)
Suelo contaminado	21.81	5.34	2.53	2.70
SC+V+Cap	19.90	32.09	6.03	4.07
SC+V+B	19.85	49.77	8.67	6.73
SC+V+P	19.80	41.88 **	6.74 **	4.46 **
SC+C+B	19.87	32.12	5.88	3.68
SC+C+Cap	20.80	41.61	5.90	4.80
SC+C+P	20.25	23.36	5.32	3.30
SC+V	20.60	24.06	6.00	3.37
SC+C	20.70	24.90	5.38	3.41
SC+B	20.90	21.38	5.06	4.22
SC+Cap.	21.20	22.18	4.66	4.43
SC+P	21.10	22.85	4.66	3.53
<b>C.V. (%)</b>		9.67	<b>10.73</b>	<b>11.74</b>
<b>Significación Estadística del ANVA</b>		<b>(**)</b>	<b>(**)</b>	<b>(**)</b>

De acuerdo al cuadro 19. Según el estadístico de Tuckey, arroja un coeficiente de variación (CV), para las variables altura de planta 9.67 por ciento, para el peso seco foliar de 10.73 por ciento, y para la variable peso seco radicular 11.74 por ciento respectivamente, lo cual indica que no hubo variación en cada uno de las repeticiones por tratamiento. Existe alta significancia estadística para las tres variables evaluadas, por lo que se considera que estas variables son importantes para evaluar la concentración

de los hidrocarburos en experimentos atípicos de biorremediación usando plantas de maíz.

Seguidamente se presenta la altura promedio del maíz en los tratamientos evaluados. Según el gráfico 07.

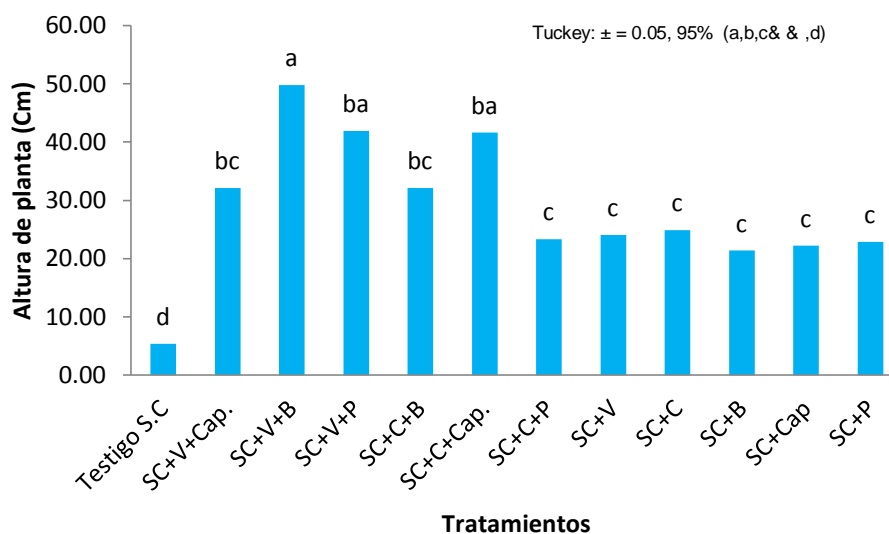


Gráfico 07. Altura promedio del maíz por tratamiento.

En el gráfico 7, se observa que el tratamiento T3, fue el que superó a todos los demás tratamientos en altura de planta (49.67 cm), por lo que la variable altura de planta es un buen indicador para evaluar el crecimiento de las plantas de maíz, con una concentración de hidrocarburos de 19.85 gr de TPH/kg de suelo contaminado, la menor altura la obtuvo el tratamiento T1, Suelo contaminado puro (5.34 cm) según se muestra en el Cuadro 18 y el Gráfico 7; respectivamente.

A continuación se presenta el promedio del peso seco foliar del maíz en los tratamientos evaluados.

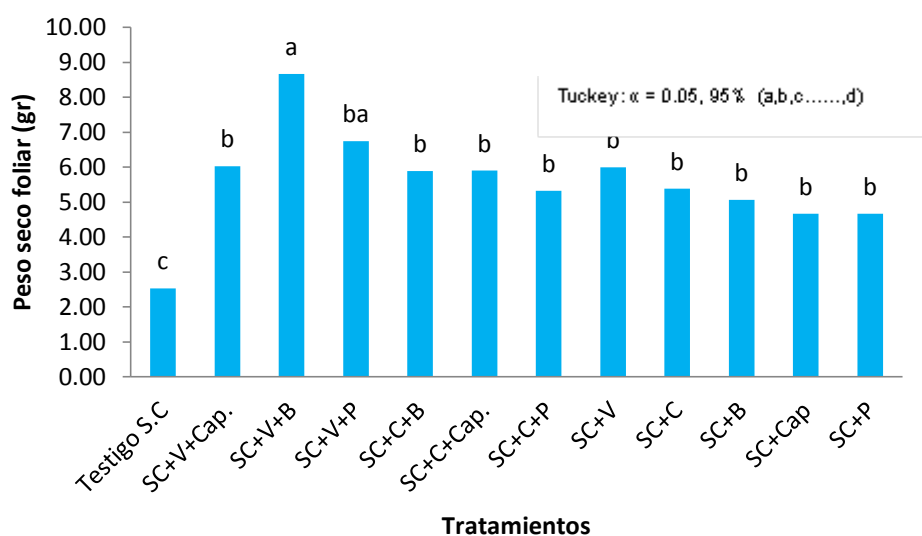


Grafico 08. Peso seco foliar promedio del maíz por tratamiento.

En grafico 08. Se presenta la variable peso seco foliar, cuyo comportamiento ha sido similar, en comparación a la variable altura de planta, es decir el tratamiento 3, T3, fue el que alcanzo el mayor peso seco foliar, sin embargo el T1. Suelo contaminado puro tuvo 2.53 gr de masa foliar seca. Lo que se muestra en el cuadro 18 y Grafico 8, respectivamente.

A continuación se presenta el promedio del peso seco radicular del maíz en los tratamientos evaluados. Según el grafico 09.

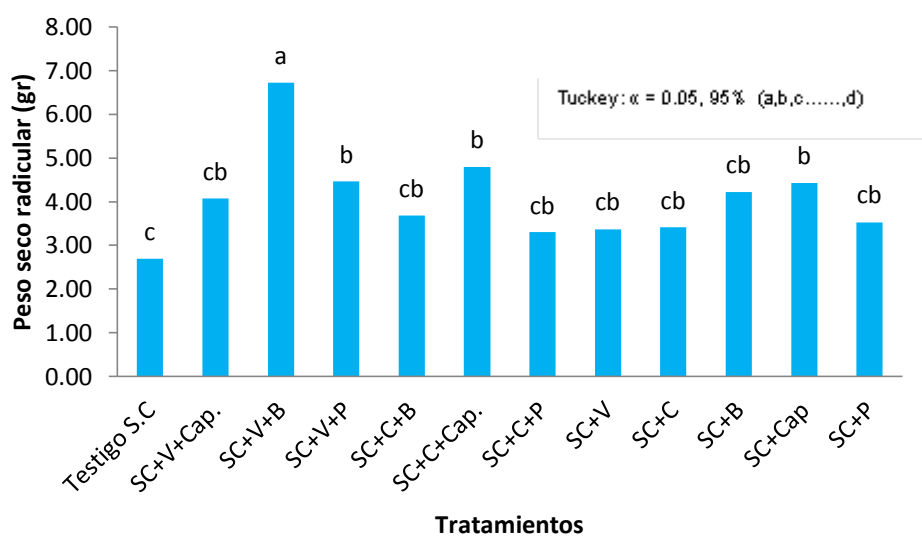


Grafico 09. Peso seco radicular promedio del maíz por tratamientos.

En grafico 09. Se presenta la variable peso seco radicular, cuyo comportamiento ha sido similar, en comparación a la variable altura de planta, y peso seco foliar. Por lo que uno de los tratamientos que menor reducción tuvo fue el tratamiento T1. Con una reducción del 2 por ciento. Lo que indica que una planta de maíz no desarrolla en un suelo con una concentración de 21.81 gr de TPH/kg de suelo. Sin embargo su escaso crecimiento se debió a las reservas de la semilla y mas no al suelo. Según el cuadro 19.

Finalmente presentamos las concentraciones de TPH iniciales y finales, así como el porcentaje y el ranking de reducción, según el cuadro 20 y 21 respectivamente.

Cuadro 20. Concentraciones de TPH iniciales y finales para el experimento y porcentaje de reducción de TPH.

Tratamientos	Dosificación	(**)TPH INICIAL (gr TPH/kg de suelo)	TPH FINAL (gr TPH/kg de suelo)
T1	Suelo Contaminado	21.81	21.37
T2	SC+V+Cap.	19.90	16.92
<b>T3</b>	<b>SC+V+B.</b>	<b>19.85</b>	<b>16.28</b>
T4	SC+V+P	19.80	16.63
T5	SC+C+B	19.87	16.59
T6	SC+C+Cap	20.80	17.89
T7	SC+C+P	20.25	17.01
T8	SC+V	20.60	18.15
T9	SC+C	20.70	18.42
T10	SC+B	20.90	19.23
T11	SC+Cap.	21.20	20.14
T12	SC+P	21.10	19.83
<b>Promedio del % de Reducción de TPH</b>			

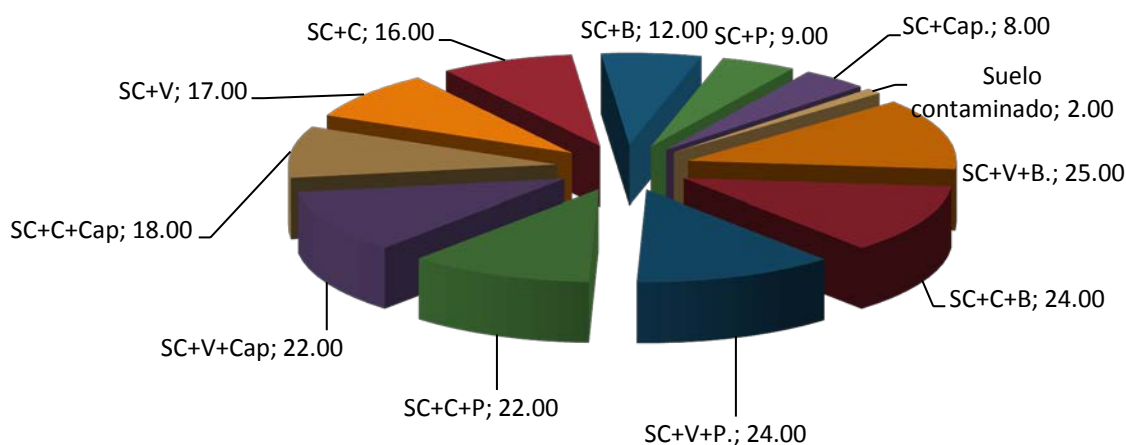
(\*\*) Expresado en gr de TPH/kg de suelo.

Según el cuadro 20. El Tratamiento T3, obtuvo el primer lugar por tener un mayor valor de reducción 25 por ciento, en comparación a los demás tratamientos, mientras que el segundo tratamiento que alcanza una significativa reducción ha sido el tratamiento T5 con 24 por ciento respectivamente, lo que se muestra en el cuadro 21.

**Cuadro 21. Ranking de reducción**

Tratamiento	Ranking	Combinacion
T3	1	SC+V+B.
T5	2	SC+C+B
T4	3	SC+V+P.
T7	4	SC+C+P
T2	5	SC+V+Cap
T6	6	SC+C+Cap
T8	7	SC+V
T9	8	SC+C
T10	9	SC+B
T12	10	SC+P
T11	11	SC+Cap.
T1	12	Suelo contaminado

El tratamiento T5, suelo contaminado, más cerdaza, más bolaina, muestran que el estiércol de cerdo por ser un animal mono gástrico, la excreta posee materia orgánica semi descompuesta lo que retarda la absorción de los nutrientes por parte de los microorganismos., lo que se atribuye al segundo lugar en el ranking de reducción. Según se muestra en el Cuadro 21 y Grafico 10, respectivamente. Cabe indicar que el estiércol de vacaza tiene una función fijadora de bacterias, mientras que el aserrín es un elemento aireador de la estructura del suelo.

**Grafico 10. Ranking de reducción por tratamiento**

## CAPITULO 5: IMPACTOS DE BIORREMEDIACION

### 5.1. Propuesta para la biorremediacion de suelos contaminados a nivel de prueba piloto.

De acuerdo al problema y la hipótesis formulada se plantea el siguiente ensayo para la siguiente solución, bajo los siguientes criterios de operación del suelo en campo.

La concentración de hidrocarburos en el suelo es de 21,810 mg/kg de suelo

- Área : 1 ha (10,000 m<sup>2</sup>)
- Elementos biorremediadores (Aserrín y Estiércol)
- Espesor del suelo : 0.30 m
- Plantas indicadoras: *Zea mays* y *Arachis pintoi*
- Datos del perfil del suelo.

Horiz.	Profundidad (cm)	Aren a (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Clase textural	Densidad aparente promedia
A	0-10 cm	60	25	15	Fr. A	1.4
C1	0.10- 0.30 cm	71	24	5	Fr. A	

- Volumen total de suelo: Profundidad x Área = 0.30 m x 10,000 m<sup>2</sup>= 3,000 m<sup>3</sup>
- Factor de esponjamiento = 10 %
- Tipo de bacterias = Rhizobium y pseudomonas (12 kg)
- Peso de la capa a remediar = Densidad aparente promedia x volumen total de suelo = 1.4 x 3,000 m<sup>3</sup> = 4,200 ton/ha.
- Tiempo= 5 años

Para biorremediar un suelo contaminado por petróleo se deberá iniciarse con las siguientes actividades.

1. **Ventilación del terreno.** Se deberá realizar con un tractor agrícola y un arado de discos de 1.5 ton, con la finalidad de voltear el suelo a una profundidad de 30 cm. Para crear condiciones a las raíces del maíz y del maní forrajero.
2. **Rastro.** Para la incorporación del el estiércol y el aserrín se deberá mullir el suelo para facilitar el crecimiento de la planta indicadora.
3. **Riego.** Se utilizara un sistema de riego por gravedad con la finalidad de minimizar costos a razón de 5000 m<sup>3</sup> por ha, dependiendo de las horas sol.
4. **Inoculación de bacterias.** Para la inoculación de las bacterias rhizobium, fijadoras de nitrógeno se recomienda trabajar con el Maní forrajero o arachis pintoí como cultivo de cobertura, cuyo requerimiento es 15,625 plantas /ha a un distanciamiento de 0.8 m entre fila y 0.8 m entre planta.
5. **Siembra.** Para la siembra del maíz se podrá realizar manualmente o utilizando una sembradora mecánica a razón de 20 cm entre planta y 80 cm entre surco, con una densidad poblacional de 62,500 plantas indicadoras por ha, pudiéndose duplicar la densidad, dependiendo del tiempo a biorremediar el suelo.
6. **Pruebas de colonias de bacterias,** para el conteo de las colonias deberá utilizarse el método estándar recomendado por la EPA, USDA.



7. **Medición de TPH inicial y final.** Para la medición del TPH, deberá realizarse un muestreo inicial y final, cada año, para ir evaluando la <sup>15</sup>resiliencia del suelo.

## 5.2. Costos de implementación de la propuesta

El costo promedio de bioremediar 1 ha de suelo contaminado con petróleo es S/. 8,059.40 nuevos soles, para el primer año y 7,779.40 para los años 2, 3, 4 y 5 respectivamente, según el siguiente cuadro de costos.

Cuadro 22. Costos de implementación al primer año

ACTIVIDAD	UNIDAD	CANTIDAD	PU	COSTO
<b>I. COSTOS DIRECTOS</b>				7,872.20
Analisis Inicial de TPH	Analisis /muestras	5	351.00	<b>1,755.00</b>
MANO DE OBRA (Operarios)				<b>60.00</b>
A. Delim. Campo	Jornal	1	20.00	20.00
B. Arado	Jornal	1	20.00	20.00
C. Rastreo	Jornal	1	20.00	20.00
E. Riego	Jornal	1	20.00	20.00
INCORPORACION				<b>180.00</b>
A. Aserrin	Jornal	2	20.00	40.00
B. Estiercol	Jornal	2	20.00	40.00
C. Maiz	Jornal	5	20.00	100.00
ALQ. MAQUINARIA AGRICOLA				<b>720.00</b>
A. Arado	Hor.	4	90.00	360.00
B. Rastra	Hor.	4	90.00	360.00
SEMILLA				4,970.00
A. Arachis pinto	Kg.	4	30.00	120.00
B. Maiz	Kg.	25	10.00	250.00
C. Agua	Lt	5000	0.32	1,600.00
D. ESTIERCOL	ton.	1	900.00	900.00
E. ASERRINES	ton.	1	900.00	900.00
Flete Traslado de insumos	Kg.	1200	1.00	1,200.00
<b>II.- COSTOS INDIRECTOS</b>				187.20
Imprevistos (Analisis final)	5%			402.97
<b>COSTO TOTAL</b>	<b>S/.</b>			<b>8,059.40</b>

<sup>15</sup> Capacidad de regenerarse el suelo, cuyo horizonte puede ser al corto, mediano y largo plazo.

Cuadro 23. Costos de implementación del año 2 al año 05.

ACTIVIDAD	UNIDAD	CANTIDAD	PU	COSTO
<b>I. COSTOS DIRECTOS</b>				7,592.20
Analisis Inicial de TPH	Analisis /muestras	5	351.00	<b>1,755.00</b>
MANO DE OBRA (Operarios)				<b>40.00</b>
B. Arado	Jornal	1	20.00	20.00
C. Rastreo	Jornal	1	20.00	20.00
D. Riego	Jornal	1	20.00	20.00
INCORPORACION				<b>120.00</b>
A. Aserrin	Jornal	2	20.00	40.00
B. Estiercol	Jornal	2	20.00	40.00
C. Maiz	Jornal	2	20.00	40.00
ALQ. MAQUINARIA AGRICOLA				<b>720.00</b>
A. Arado	Hor.	4	90.00	360.00
B. Rastra	Hor.	4	90.00	360.00
SEMILLA				4,770.00
A. Cobertor	Kg.	4	30.00	120.00
B. Maiz	Kg.	25	10.00	250.00
C. Agua	Lt	5000	0.32	1,600.00
D. ESTIERCOL	ton.	1	800.00	800.00
E. ASERRINES	ton.	1	800.00	800.00
Flete Traslado de insumos	Kg.	1200	1.00	1,200.00
<b>II.- COSTOS INDIRECTOS</b>				187.20
Imprevistos (Analisis final)	5%			388.97
<b>COSTO TOTAL</b>	<b>SI.</b>			<b>7,779.40</b>

### 5.3. Beneficios que aporta la propuesta.

#### 5.3.1. Impactos positivos

Los principales impactos ambientales positivos para el suelo, que se generan con la biorremediación usando aserrines y estiércoles son los siguientes:

- Disminución de hidrocarburos en el suelo
- Incremento de la colonia de bacterias del genero pseudomona.
- Mantenimiento de humedad en el suelo por la cobertura.
- Accesibilidad y bajo costo para el acopio de estiércol de vaca, relativo bajo costo para acopio de aserrines de madera blanca.
- Aprovechamiento del maíz.

### 5.3.2. Impactos negativos

Entre los principales impactos ambientales negativos que la técnica de biorremediación genera son:

- Alteración del paisaje, como consecuencia de la remoción de suelo contaminado para su excavación y luego su devolución sobre la geomembrana.
- Contaminación del aire por el polvo, producto del uso de maquinaria
- Tala de algunos arbustos y árboles para su fácil remoción del suelo en campo.
- Alteración de la fauna del sub suelo y también el ruido ambiental.

## CONCLUSIONES

1. El tratamiento de mayor reducción en la concentración de los hidrocarburos totales de petróleo, ha sido: Suelo dosificado con vacaza más aserrín de bolaina (T3). Puesto que de 21.81 gr de TPH/kg de suelo se redujo a una concentración de 16.28 gr de TPH/kg de suelo, que representa una reducción del 25 por ciento.
2. Los suelos contaminados con hidrocarburos, tratados con aserrín y estiércoles orgánicos en promedio disminuyo 22.5 por ciento del contenido de hidrocarburos en el suelo. Empleando solo estiércol disminuyo solo 16.5 por ciento y usando solamente aserrines disminuyo 9.6 por ciento.
3. Los suelos contaminados tratados con estiercol organico más aserrínes, utilizados como sustratos para la planta del maíz, tuvieron en promedio 36.80 Cm de altura de planta, en comparación a los tratamientos de suelos contaminados usando solamente estiércol un promedio de 24.48 cm y utilizando solamente aserrín un promedio de 22.14 cm.
4. Los suelos contaminados tratados con estiercol organico, más aserrines, utilizados como sustratos para la planta del maíz, tuvieron en promedio 6.42 gr de peso seco foliar, en comparación a los tratamientos de suelos contaminados usando solamente estiércol un promedio 5.68 gr y utilizando solamente aserrín un promedio de 4.79 gr.
5. Los suelos contaminados tratados con estiercol organico, más aserrínes, utilizados como sustratos para la planta del maíz, tuvieron en promedio 4.50 gr de peso seco radicular, en comparación a los tratamientos de suelos contaminados usando

solamente estiércol un promedio 3.39 gr y utilizando solamente aserrín un promedio de 4.06 gr.

6. La planta de maíz es un buen indicador para evaluar la reducción de la concentración de hidrocarburos en los suelos contaminados a través de sus variables la altura de la planta, peso seco foliar y peso seco radicular.
  
7. El cultivo de maíz ha tenido una mayor altura de planta, mayor peso seco foliar, y peso seco radicular, cuando los suelos contaminados con hidrocarburos han sido tratados de manera conjunta mediante estiércoles mas aserrines y menos desarrollo cuando solamente han sido tratados con estiércol o aserrines.

## RECOMENDACIONES

1. Se recomienda el uso de estiércoles orgánicos, como vacaza y cerdaza más aserrines de especies maderables del tipo suave (Bolaina y pino) como fuente de remediación para suelos contaminados con hidrocarburos.
2. Se recomienda el uso de estiércoles y aserrines porque es una tecnología de bajo costo y de fácil manejo, para mejorar la resiliencia del suelo.
3. Aplicar esta técnica de biorremediación a los suelos contaminados de la refinera la pampilla y otros lugares con condiciones similares.
4. Realizar la prueba piloto propuesta para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos para una hectárea de terreno en campamentos con suelos contaminados; usando plantas nativas tolerantes a los hidrocarburos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### Libros

ALKORTA, I. y GARBISU, C. 2001. Phytoremediation of organic contaminación in soils. *Bioresource Technology* 79:273-276.

AMAKIRI, J. y ONOFEGHARA F. 1984. Effect of crude oil pollution on the growth of *Zea mays*, *Abelmoshus esculentus* and *Capsicum frutescens*. *Oil Petrochemical Pollution*. 1 199-205.

ARBAIZA, (2011). Centro Internacional de Tecnología y Transformación de la Madera. CITE. Ucayali. Perú.

BARTOLINI, R. 1990. El maíz. Editorial Paraninfo. Madrid. 276.

BERKELLEY. 2011. Laboratorio de biorremediación. EE.UU.

CHANEAU, C., MOREL, J. y OUDOT, J. 1996. Land Traedment of oil based drill cutting in an agricultural soil. *Journal of Enviromental Quality*, 4: 858-867.

COONEY, J., SILVER, S. y BECK, E. 1985. Factors influencing hydrocarbons degradation in three freshwater lakes. *Microbial Ecology*, 11: 127-237.

ESCALANTE, E. 2000. Estudio de Ecotoxicidad de un suelo contaminado con hidrocarburos. Tesis para obtener el grado de maestro en biotecnología. Universidad Autonoma Metropolitana, México. D.F.

FRICK, C. M., R. E. Farrell y J. J. Germida. 1999. Assessment of Phytoremediation as an in situ Technique for Cleaning Oil-Contaminated Sites. Petroleum Technology Alliance of Canada. Vancouver, British Columbia.

GUERRERO, J. 2001. El Compost un abono orgánico compuesto para mejorar y dar vida a nuestros suelos. Taller de conservación de suelos y agricultura sostenible. UNALM. Lima.

IMCL (Intendencia Municipal de Cerro Largo). 2004. Producción de Compostaje. Uruguay.

INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGIA, 2003. Ambiente y Desarrollo. Lima, Perú.

MANRIQUE, et al 1988. Programa Cooperativo Investigaciones en Maíz. BAN. UNALM. Perú.

MARTINEZ, E. y LOPEZ, F. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas del suelo arcilloso. Terra, 10: 9-17.

MORGAN Y WATKINSON. 1989. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. España. Madrid.

NAVARRO, et al, 2001. La biorremediación en Perú. Lima-Perú. 2001

WHITE, D. 1995. The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes. Oxford University Press, Oxford, 10.

WHITE K. L. 1999. An overview of immunotoxicology and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. Environ Carcinogen.

## **Manuales**

ALVARADO, P. 2004. Producción de Compostaje. Facultad de Agronomía, Universidad de Santiago. Chile.

APROLAB, 2007. Manual para la producción de compost orgánico con microorganismos eficaces. Lima. Perú.

AVENDAÑO, D. 2003. El proceso de compostaje. Tesis Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago

GUERRERO, J. 1993. Manual de Abonos Orgánicos. Tecnología para el Manejo Ecológico de Suelos. RAAA. Lima, PE. 90p.

JUZCAMAYTA, J. 2007. Biorremediación de suelos contaminados mediante el uso de organismos vivos. Lab. de biorremediación de la UNALM. Lima. Perú.



INTEC (Instituto Tecnológico de Chile). 1999. Manual de compostaje. (en línea). Corporación de Investigación Tecnológica de Chile. Consultado 16 febrero del 2005.

### **Tesis**

AREVALO, J.C. 2011. CGTA. Evaluación de 15 accesiones de MAD, en un suelo entisol. Tesis de Ing. Perú.

LA ROSA, D. 2000. Evaluación de 4 abonos orgánicos en el rendimiento de los cultivos de col y coliflor en la Molina. Tesis UNALM. Lima.

EYZAGUIRRE, C. 2007. Curso de estadística e informática. Métodos estadísticos para la investigación 1. UNALM. Lima. Perú.

KIMURA, R. 2005. Evaluación de los efectos del producto "ENZYMPLUS" (activador biológico) en la elaboración de compost utilizando dos tipos de estiércol (vacuno y ovino). Tesis UNALM. Lima.

OCAMPO, J; ROBLES, D; WU, A. 2002. El Compostaje como método de Bioremediación de Suelos contaminados con hidrocarburos. Tesis UNALM. Lima, 81p.

### **Boletines**

DALZELL, H. 1991. Manejo del suelo: producción y uso del compostaje en ambientes tropicales y subtropicales. Boletín N° 56. FAO.

ESPINOZA, 1999. Boletín N° 04. Refinería la Pampilla. Callao. Peru.

PLUSPETROL. 2007. Boletín N° 02. Campamento de Biorremediación. Río Corrientes. Iquitos Perú.

### **Cursos**

VISITACION, R. 2011. Curso de suelos: Centro de Gestión y Tecnología Ambiental. UNALM. Perú

GUERRERO, 2002. Curso de suelos. Centro de Gestión y Tecnología Ambiental. UNALM-Perú

**Norma legal**

MEM. 1993. Ley Orgánica de Hidrocarburos. Perú

**Internet en línea.**

USEPA OUST, 2003. Environmental Fact Sheet: Analytical Métodos for Fuel Oxygenates, EPA 510-F-03-001. <http://www.epa.gov/OUST/mtbe/omethods.pdf>.

VAVREK et al, 2003. Diagrama esquemático del ciclo de las plantas vasculares sin semilla. De climas templados. [es.wikipedia.org/wiki/Osmundaceae](http://es.wikipedia.org/wiki/Osmundaceae)

**ANEXOS**

***RESUMEN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO***

***ENVIROLAB PERÚ SAC***

***LAB. SUELOS: UNALM, SUELO CONTAMINADO***

Obs	TRAT	ALTURA	PSFOL	PSRAD
1	1	5.33	2.32	2.43
2	1	5.45	2.34	2.86
3	1	5.25	2.94	2.82
4	2	37.29	6.12	4.32
5	2	26.38	5.99	3.89
6	2	32.60	5.97	3.99
7	3	48.32	8.87	6.29
8	3	51.00	8.39	7.56
9	3	50.00	8.76	6.34
10	4	39.42	5.90	3.49
11	4	50.83	6.43	4.56
12	4	35.38	7.89	5.32
13	5	31.58	6.90	4.32
14	5	33.45	5.13	3.34
15	5	31.32	5.62	3.38
16	6	34.28	7.02	5.09
17	6	47.87	5.39	4.89
18	6	42.67	5.28	4.43
19	7	26.98	5.49	3.45
20	7	17.00	5.40	3.42
21	7	26.09	5.09	3.04
22	8	21.09	5.67	3.11
23	8	27.00	5.20	3.26
24	8	24.09	7.12	3.74
25	9	24.42	4.98	2.35
26	9	25.87	4.38	3.31
27	9	24.42	6.79	4.56
28	10	20.89	5.10	4.34
29	10	23.37	5.12	4.67
30	10	19.87	4.96	3.65
31	11	21.55	4.89	4.56
32	11	22.55	4.19	4.31
33	11	22.45	4.90	4.42
34	12	23.55	4.89	3.56
35	12	21.55	4.19	3.61
36	12	23.45	4.90	3.42

VARIABLES: 3

### The ANOVA Procedure

#### Class Level Information

Class      Levels    Values

TRAT            12    1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Number of observations    36

VARIABLES: 3

### The ANOVA Procedure

Dependent Variable: ALTURA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	4641.373431	421.943039	26.77	<.0001 (**)
Error	24	378.238200	15.759925		
Corrected Total	35	5019.611631			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ALTURA Mean
0.924648	13.94829	3.969877	28.46139

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	11	4641.373431	421.943039	26.77	<.0001
VARIABLES: 3					

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: PSFOL

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	68.48026667	6.22547879	12.45	<.0001
Error	24	11.99893333	0.49995556		
Corrected Total	35	80.47920000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	PSFOL Mean
0.850906	12.69435	0.707075	5.570000

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	11	68.48026667	6.22547879	12.45	<.0001
VARIABLES: 3					

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: PSRAD

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	35.22790000	3.20253636	10.74	<.0001
Error	24	7.15320000	0.29805000		
Corrected Total	35	42.38110000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	PSRAD Mean
0.831217	13.45231	0.545940	4.058333

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	11	35.22790000	3.20253636	10.74	<.0001

VARIABLES: 3

Tukey Grouping	Mean	N	TRAT
A	49.773	3	3 (**)
B A	41.877	3	4 (*)
B A	41.607	3	6 (*)
B C	32.117	3	5
B C	32.090	3	2
C	24.903	3	9
C	24.060	3	8
C	23.357	3	7
C	22.850	3	12
C	22.183	3	11
C	21.377	3	10

D 5.343 3 1  
 VARIABLES: 3

The ANOVA Procedure

Tukey Grouping	Mean	N	TRAT
A	8.6733	3	3
A			
B A	6.7400	3	4
B			
B	6.0267	3	2
B			
B	5.9967	3	8
B			
B	5.8967	3	6
B			
B	5.8833	3	5
B			
B	5.3833	3	9
B			
B	5.3267	3	7
B			
B	5.0600	3	10
B			
B	4.6600	3	11
B			
B	4.6600	3	12
C	2.5333	3	1

Tukey Grouping	Mean	N	TRAT
A	6.7300	3	3
B	4.8033	3	6
B			
B	4.4567	3	4
B			
B	4.4300	3	11
B			
C B	4.2200	3	10
C B			

C	B	4.0667	3	2
C	B			
C	B	3.6800	3	5
C	B			
C	B	3.5300	3	12
C	B			
C	B	3.4067	3	9
C	B			
C	B	3.3700	3	8
C	B			
C	B	3.3033	3	7
C				
C		2.7033	3	1