

ESCUELA SUPERIOR POLITÈCNICA DE CHIMBORAZO



FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÌMICAS

**“BIORREMEDIACIÒN DE VEGETACIÒN CONTAMINADA CON
PETRÒLEO POR DERRAMES EN EL CAMPAMENTO
GUARUMO – PETROPRODUCCIÒN.”**

TESIS DE GRADO

PREVIA A LA OBTENCIÒN DEL TÌTULO DE:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÌA AMBIENTAL

AUTOR:

VERÒNICA PAULINA OROSCO VERDEZOTO

MERCEDES MARGARITA SORIA GUANO

RIOBAMBA-ECUADOR

2008

AGRADECIMIENTO

Agradezco a DIOS por permitirme la vida para poder cursar mis estudios y la exitosa culminación de mi carrera.

A mis padres Lida Verdezoto, Javier Orozco por convertirse en el motor que siempre me han impulsado para ser mejor persona.

Al excelente grupo de profesores que formaron parte especial en mi vida, por impartirnos todos sus sabios conocimientos y su gran amistad.

Al Dr. Fausto Yaulema, por su valioso aporte y colaboración en el desarrollo de la presente tesis. A los señores profesores, miembros del tribunal, Dra. Nancy Veloz, Dr. Roberto Erazo.

Al Ing. Kadir Ron jefe del departamento de Unidad de Protección Ambiental (PETROPRODUCCIÓN), con su ayuda ha sido posible dentro de la empresa llevar a cabo nuestro trabajo

A mis amigas y compañeros que directa o indirectamente han contribuido a la culminación de este proyecto.

PAULINA

AGRADECIMIENTO

A Dios por el infinito amor y paciencia que brindo a mi vida para concluir con mis metas fijadas, a mis padres; José Soria y Rosa Guano quienes con su apoyo y su valiosa colaboración han permitido el progreso de esta investigación y el regalo mas hermoso mi protección.

Al personal de las cuadrillas del Departamento de Unidad de Protección Ambiental (PETROPRODUCCIÓN), quienes prestaron su incondicional ayuda en el campo de trabajo, durante toda la fase del desarrollo experimental del presente trabajo.

Al personal del Laboratorio del Departamento de Unidad de Protección Ambiental de Lago Agrio (PETROECUADOR), quienes prestaron una incondicional colaboración en el desarrollo de los análisis físicos y químicos del presente trabajo.

Al Ingeniero Kadir Ron, jefe del Departamento de Unidad de Protección Ambiental del Campamento (Guarumo), quien estuvo siempre pendiente del trabajo en desarrollo en el Campamento el Libertador (Guarumo) en dónde se ejecuto el proyecto de investigación.

MARGARITA

DEDICATORIA

A DIOS, y a los seres más preciados y queridos de mi vida que me han apoyado de manera incondicional en la culminación de una de las etapas más importantes de mi carrera superior como son: mis padres Javier Orozco y Lida Verdezoto, mi hermana Luisa Fernanda Orozco a quienes le debo mi progreso y superación.

PAULINA

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis Padres: Rosa Guano y José Soria, quienes con su valiosa comprensión, paciencia, colaboración y cariño me han enseñado a perseverar hasta lograr mis metas y objetivos, en especial a mis hijos por quienes puse un especial esfuerzo para culminar mi carrera.

A mis hermanos por brindarme confianza, cariño y apoyo.

MARGARITA

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Dr. Edmundo Caluña
DECANO DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS.

Dr. Robert Cazar
DIRECTOR DE LA ESCUELA
DE CIENCIAS QUÍMICAS.

Dr. Fausto Yaulema
DIRECTOR DE TESIS

Dra. Nancy Veloz
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Roberto Erazo
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Lic. Carlos Rodríguez
DIRECTOR DEL CENTRO
DE DOCUMENTACIÒN

NOTA DE TESIS ESCRITA

-

Nosotras, *VERÒNICA PAULINA OROSCO Y MERCEDES MARGARITA SORIA GUANO*, somos responsables de las ideas doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis de Grado pertenecen a la ESCUELA SUPERIOR POLITÈCNICA DE CHIMBORAZO.

VERÒNICA PAULINA OROSCO
VERDEZOTO

MERCEDES MARGARITA SORIA
GUANO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Cd	Cádmio
DINAPA	Dirección Nacional de Protección Ambiental
EPA	Environmental Protection Agency (USA)
g	Gramo
LABPAM	Laboratorio de Protección Ambiental de Petroproducción
mg/Kg.	Miligramos por Kilogramo
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
Ni	Níquel
TPH	Hidrocarburos Totales de Petróleo
Pb	Plomo
ppm	Partes por millón
RAOHE	Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN:

CAPÍTULO I:

1.	MARCO TEÓRICO	
1.1	Petróleo.....	22
1.1.1	Generalidades.....	22
1.1.2	Origen del Petróleo.....	22
1.1.3	Características Químicas.....	23
1.1.4	Contaminantes.....	25
1.1.4.1	Hidrocarburos totales de petróleo.....	25
1.1.4.2	Metales Pesados (Cd, Ni, Pb).....	26
1.1.4.3	Efectos de los contaminantes en la Salud y el Ambiente.....	27
1.2	Biorremediación de vegetación con hidrocarburos.....	28
1.2.1	Vegetación.....	28
1.2.2	Identificación de la cobertura vegetal.....	29
1.2.3	Mejoradores y nutrientes.....	30
1.2.4	Fertilizantes orgánicos.....	30
1.3	Biorremediación.....	31
1.3.1	Generalidades.....	31
1.3.2	Tipos de Biorremediación.....	37
1.3.3	Tecnologías de Biorremediación.....	40
1.3.4	Fundamento bioquímico de la biodegradación.....	41
1.3.5	Técnica de Biorremediación a aplicarse (Compost).....	43
1.3.5.1	Composteo.....	43
1.3.5.2	Factores que condicionan el proceso de compostaje.....	44
1.3.5.3	Proceso de compostaje.....	45

1.3.5.4	Sistemas de compostaje.....	46
1.3.5.5	Tipos de Compostaje.....	48
1.3.6	Biorremediación por Bioestimulación.....	48
1.3.7	Límites Permisibles.....	50
1.3.8	Ventajas y desventajas de la Biorremediación.....	50
1.4	Bacterias	52
1.4.1	Generalidades.....	52
1.4.2	Microorganismos degradadores de petróleo.....	54

CAPÍTULO II

2	MATERIALES Y MÉTODOS	56
2.1	Materiales.....	56
2.1.1	Lugar Experimental.....	56
2.1.2	Materiales Experimentales.....	56
2.1.2.1	Vegetación Contaminada con Petróleo.....	56
2.1.2.2	Sustratos.....	57
2.1.2.3	Bacterias de la zona.....	57
2.1.3	Materiales de laboratorio.....	58
2.2	MÉTODOS	60
2.2.1	Muestreo.....	60
2.2.1.1	Recolección del material contaminado (Campo)	60
2.2.1.2	Análisis de muestra (Laboratorio).....	62
2.2.1.3	Descripción de la tecnología a aplicarse.....	62
2.2.2	Métodos Analíticos.....	65
2.2.2.1	Determinación de Temperatura.....	65
2.2.2.2	Determinación de Humedad.....	65
2.2.2.3	Determinación de (bacterias).....	65
2.2.2.4	Determinación de Potencial de Hidrógeno.....	66
2.2.2.5	Determinación de Hidrocarburos Totales.....	66
2.2.2.6	Determinación de metales pesados (Cd, Ni, Pb).....	66

2.2.2.7	Determinación del Nitrógeno global.....	67
2.2.2.8	Determinación del Fósforo.....	68
2.2.3	Metodología Recuento de Aerobio Mesòfilos.....	68
2.2.3.1	Preparación de la técnica Aerobios Mesòfilos.....	68
2.3	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	69
2.3.1	Metodología.....	70
2.3.1.1	Tipo de Diseño.....	70
2.3.1.2	Modelo Matemático.....	70
2.3.1.3	Factores de estudio tratamientos y réplicas.....	71
2.3.1.4	Preparación de tratamientos.....	71
2.3.1.5	Parámetros de Control.....	74
2.3.1.6	Parámetros de Medición.	75
2.3.1.7	Análisis de Datos.....	77

CAPÍTULO III

3	RESULTADOS Y DISCUSIÒN	78
3.1	Caracterización de vegetación contaminada por derrames de petróleo.....	78
3.2	Parámetros de control durante la biorremediación.....	79
3.2.1	Potencial de Hidrógeno.....	80
3.2.2	Humedad.....	
3.3.3	Microorganismos aeróbios mesòfilos.....	81
3.3.4	Control de Nutrientes C, N , P.....	83
3.3	Parámetros de medición durante la biorremediación.....	85
3.3.1	Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH).....	85
3.3.2	Metales pesados (Cadmio).....	89
3.3.3	Níquel.....	90
3.3.4	Plomo.....	91
3.4	Eficiencia de los parámetros de medición de los tratamientos	92

	durante la biorremediación.....	
3.4.1	Eficiencia de Hidrocarburos de Petróleo (TPH).....	92
3.4.2	Eficiencia de Metales Pesados (Cd).....	92
3.4.3	Eficiencia de Metales Pesados (Ni).....	94
3.4.4	Eficiencia de Metales Pesados (Pb).....	95

CAPÍTULO IV

4.1	Conclusiones.....	96
4.2	Recomendaciones.....	98

RESUMEN

SUMMARY

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÌNDICE DE ANEXOS

- ANEXO 1.** Diagn3stico Ambiental de la Regi3n.
- ANEXO 2.** **RH-300** Producto Biodegradable para tratamiento de residuos aceitosos, suelos contaminados por hidrocarburos y derivados
- ANEXO 3.** Hoja de seguridad del material: RH-300
- ANEXO 4.** Valores medios de los par3metros de control (pH, Humedad, Aerobios Mes3filos).
- ANEXO 5.** Valores medios de los par3metros de medici3n (TPH, Cd, Ni, Pb).
- ANEXO 6.** Fotografías del Centro de Acopio Biorremediaci3n (Compost).
- ANEXO 7.** Fotografías análisis realizados laboratorio(LABPAM)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Composición elemental del petróleo.....	23
Tabla 2.	Tipos de Hidrocarburos.....	25
Tabla 3.	Impactos de metales pesados en la Salud y Ambiente.....	27
Tabla 4.	Impactos de TPH en la Salud y Ambiente.....	28
Tabla 5.	Principales características de las unidades de vegetación.....	29
Tabla 6.	Principales especies.....	29
Tabla 7.	Capacidad de biodegradación.....	43
Tabla 8.	Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en la Industria Hidrocarburífera.....	51
Tabla 9.	Grupos de microorganismos según su Temperatura.....	53
Tabla 10.	Materiales, Reactivos.....	58
Tabla 11.	Equipos utilizados.....	59
Tabla 12.	Métodos de análisis procedimiento laboratorio.....	64
Tabla 13.	Parámetros de Control (pH, °T, %H, UFC/g).....	74
Tabla 14.	Parámetros de Medición (HAP`s, TPH, Cd, Ni, Pb).....	75
Tabla 15.	Represtación generalizada de las repuestas experimentales en un diseño de bloques.....	76
Tabla 16.	Fórmulas para ANOVA para un diseño de un factor.....	77
Tabla 17.	Caracterización de vegetación contaminada con Petróleo.....	79
Tabla 18.	Análisis tabla de ANOVA TPH.....	87
Tabla 19.	Prueba de TUKEY para TPH	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Parámetros implicados en la Biorremediación.....	32
Figura 2.	Diferentes modos de Biorremediación.....	38
Figura 3.	Metabolismo Microbiano.....	40
Figura 4.	Degradación aerobio, anaerobia.....	42
Figura 5.	Representación esquemática de biopilas alargadas.....	47
Figura 6.	Representación esquemática de bioplilas estáticas.....	47
Figura 7.	Estructura de la célula bacteriana.....	53
Figura 8.	Esquema de la gradilla de muestreo.....	61
Figura 9.	Ubicación de Tratamientos y Réplicas.....	73
Figura 10.	Monitoreo del pH durante toda la Biorremediación.....	80
Figura 11.	Monitoreo de Humedad durante la Biorremediación.....	81
Figura 12.	Monitoreo de Microorganismos de Aeróbios Mesófilos durante la Biorremediación.....	82
Figura 13.	Monitoreo de Carbono Orgánico.....	83
Figura 14.	Monitoreo de Fósforo.....	84
Figura 15.	Monitoreo de Nitrógeno Total.....	88
Figura 16.	Monitoreo del TPH durante la Biorremediación.....	85
Figura 17.	Monitoreo del Cadmio durante la Biorremediación.....	90
Figura 18.	Monitoreo del Níquel durante la Biorremediación.....	91
Figura 19.	Monitoreo del Plomo durante la Biorremediación.....	92
Figura 20.	Eficiencia del TPH.....	93
Figura 21.	Eficiencia del Cd.....	94
Figura 22.	Eficiencia del Ni.....	94
98Figura 23.	Eficiencia del Pb.....	95

INTRODUCCIÓN

Las actividades petroleras en el Ecuador, han constituido la fuente de financiamiento más importante del presupuesto del estado. Es innegable su importancia en la economía nacional y en los cambios operados en el desarrollo de las fuerzas productivas, sin embargo, también ha generado graves problemas de contaminación ambiental, pérdida irreversible de especies animales y vegetales, deterioro de las fuentes de agua y un agresivo proceso de aculturación de sus comunidades nativas

La actividad petrolera estatal ha sido la principal fuente de contaminación por los derrames provocados en el Distrito Amazónico. Un hecho inusual y alarmante es el alto porcentaje de atentados o sabotajes a las líneas de producción.

Los daños ambientales ocasionados por la industria petrolera estatal, sea cual fuere su origen, son causales de sanciones estipuladas en la Constitución de la República, la Ley de Gestión Ambiental, el Reglamento Sustitutivo del Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador (D.E.1215), entre otros, que pueden ir desde multas hasta paralizaciones de la actividad e incluso la cárcel para algunos funcionarios que por acción u omisión permitieran la alteración del medio ambiente. **(22)**

El campo libertador la primera necesidad que se hizo latente, fue la eliminación de los residuos contaminados con Petróleo que son almacenados en las piscinas de Secoya.

La contaminación por hidrocarburos es un problema importante en la mayor parte de los países productores de petróleo, por tal razón tanto la empresa estatal como privada ve la necesidad de realizar trabajos basados en la Legislación Ambiental que permiten de alguna manera remediar este problema de contaminación ambiental, a través de técnicas de biorremediación es el uso de los microorganismos vivos para la eliminación de contaminantes ambientales es una de las tecnologías aplicables a este fin, se caracteriza por ser una técnica de bajo costo de operación. La aplicación de este tipo de tecnología ha encontrado cierta resistencia de aplicación por el tiempo que demanda completar un proceso hasta obtener las metas de limpieza deseadas.

(15)

Es así que a través del convenio PETROECUADOR-ESPOCH se da la oportunidad de realizar nuestra investigación, la cual está enmarcada dentro de la "Biotecnología Ambiental" ya que se va a utilizar microorganismos autóctonos para el control de la contaminación. Junto con el personal de Unidad de Protección Ambiental, hemos trabajado con los residuos de vegetación de la estación Shuara 09 tal caso ocurrido en el mes de Noviembre del 2007 en un derrame en la línea de transferencia.

El residuo contaminado fue trasladado desde la estación hasta el Campamento Guarumo para dar su respectivo tratamiento a los desechos generados por desbroce de vegetación en los suelos con crudo, se utilizó la técnica de Biorremediación por Compost que es una técnica innovadora, de bajo costo de operación.

Estos sistemas de descontaminación se basan en la digestión de las sustancias orgánicas por los microorganismos, de la cual obtienen la fuente de carbono necesaria para el crecimiento de sus células y una fuente de energía para llevar a cabo todas las funciones metabólicas que necesitan sus células para su crecimiento. Para que estos procesos metabólicos se lleven a cabo, y puedan ser utilizados como una técnica remediativa, será necesario que existan en el medio unas condiciones físico-químicas óptimas. **(17)**

Cada uno de estos sistemas, bioventing y biopilas, precisarán de unos parámetros de evaluación adecuados a cada uno, que deben encontrarse dentro de un intervalo óptimo para que la aplicación de dicha técnica sea factible y efectiva.

En general, se necesitará la existencia de determinadas poblaciones de microorganismos autóctonos pertenecen a la familia de *Pseudomonaceae* capaces de utilizar los hidrocarburos como fuente nutricional y de energía, así como unas condiciones adecuadas de pH, nutrientes, temperatura, humedad,

concentración de los contaminantes. Dadas las condiciones favorables de la vegetación no hubo necesidad de inocular microorganismos exógenos, se utilizo microorganismos autóctonos es considerada como la vía más efectiva para remediar la vegetación contaminada en contraste a alternativas más costosas como la incineración. Además es una técnica que puede ser aplicada in –situ o ex situ. **(16)**

En el presente trabajo se plantea los siguientes objetivos:

GENERAL:

- Biorremediar los desechos generados por desbroce de vegetación en los suelos contaminados con crudo en el campamento Guarumo - Petroproducción.

ESPECÍFICOS:

- Determinar el número más probable de microorganismos presentes en la vegetación.
- Estimular los microorganismos nativos apropiados para biodegradar el crudo presente en la vegetación.
- Controlar por medio de parámetros físico químicos y microbiológicos la biorremediación.
- Evaluar el seguimiento de la biorremediación de la vegetación contaminada, aplicando el metodología de Compostaje
- Determinar la eficiencia de degradación.
- Determinar el tratamiento más eficiente para degradar los residuos.

CAPÍTULO I

1 MARCO TEÓRICO

1.1 PETRÓLEO

1.1.1 Definición (generalidades)

Es un líquido oleoso bituminoso de origen natural compuesto por diferentes sustancias orgánicas. Se encuentra en grandes cantidades bajo la superficie terrestre y se emplea como combustible y materia prima para la industria química.

1.1.2 Origen del petróleo

Según la teoría más aceptada, el origen del petróleo y del gas natural es de tipo orgánico y sedimentario. Se formó como resultado de un complejo proceso físico-químico en el interior de la tierra, que, debido a la presión y las altas temperaturas, se van descomponiendo las materias orgánicas que estaban formadas especialmente por fitoplancton y el zooplancton marinos, así como por materia vegetal y animal, que se fueron depositando en el pasado en lechos de los grandes lagos, mares y océanos. A esto se unieron rocas y mantos de sedimentos. A través del tiempo se transformó esta sedimentación en petróleo y gas natural.

La composición elemental del petróleo normalmente está comprendida dentro de los siguientes intervalos:

Tabla 1. Composición elemental del petróleo

Elemento	Peso %
Carbón	84-87
Hidrógeno	11-14

Azufre	0-2
Nitrógeno	0.2

Fuente: José Luis Lescano; quinua, tarwi Universidad Católica Santa María, Arequipa. www.ucsm.edu.pe.

1.1.3 Características

Todos los tipos de petróleo se componen de hidrocarburos, aunque también suelen contener unos pocos compuestos de azufre y de oxígeno. El petróleo contiene elementos gaseosos, líquidos y sólidos. La consistencia varía desde un líquido tan poco viscoso como la gasolina hasta un líquido tan espeso que apenas fluye.

Existen categorías de petróleos crudos los de tipo parafínico, los de tipo asfáltico y los de base mixta. Dependiendo del número de átomos de carbono y de la estructura de los hidrocarburos que integran el petróleo, se tienen diferentes propiedades que los caracterizan y determinan su comportamiento como combustibles, lubricantes, ceras o solventes.

Las cadenas lineales de carbono asociadas a hidrógeno, constituyen las parafinas; cuando las cadenas son ramificadas se tienen las isoparafinas; al presentarse dobles uniones entre los átomos de carbono se forman las olefinas; las moléculas en las que se forman ciclos de carbono son los naftenos, y cuando estos ciclos presentan dobles uniones alternas (anillo bencénico) se tiene la familia de los aromáticos.

Además hay hidrocarburos con presencia de azufre, nitrógeno y oxígeno formando familias bien caracterizadas, y un contenido menor de otros elementos. Al aumentar el peso molecular de los hidrocarburos las estructuras se hacen verdaderamente complejas y difíciles de identificar químicamente con precisión. **(8)**

Cuanto más ligero es un crudo, mayor es su número de °API. Los valores del peso específico relativo en °API para los crudos normales oscilan entre 5 a 60 °API. En general, los crudos ligeros poseen un peso específico elevado en °API, pequeña viscosidad, escasa tendencia aditiva y alta tendencia a emulsificarse. Lo inverso ocurre para los crudos pesados.

Al agua (en donde se inicia la escala de valores de la densidad expresada en grados API), le pertenece un valor de 10 °API. **(4)**

Los grados API se utilizan asimismo para determinar el precio de un crudo determinado, dado que cuanto mayor sea el valor en °API, mayor es la proporción de crudo utilizable, principalmente en fracciones ligeras (nafta ligera, etc).

Según la densidad, los crudos pueden ser clasificados en:

Tabla 2. Tipos de Hidrocarburos

Tipo de	°API	Densidad
---------	------	----------

Hidrocarburo		(kg/m³)
Liviano	>31,1	<970
Medio	22,3 – 31,1	920 - 870
Pesado	10,0 – 22,3	1000 - 920
Extra Pesado	<10	> 1000

Fuente: Freeman, Bob A; Microbiología de Burrows 22a Edición, Editorial Interamericana, España 1986. Pags. 57-62.

Para los hidrocarburos, la densidad es función del peso molecular. Los crudos parafínicos poseen una densidad menor, los aromáticos una mayor densidad, mientras que los fagénicos poseen densidades intermedias.

1.1.4 Contaminantes

1.1.4.1 Hidrocarburos totales de petróleo

Los TPH son una mezcla de productos químicos compuestos principalmente de hidrógeno y carbono, llamados hidrocarburos. Los científicos han dividido a los TPH en grupos de hidrocarburos de petróleo que se comportan en forma similar en el suelo o el agua. Estos grupos se llaman fracciones de hidrocarburos de petróleo. Cada fracción contiene muchos productos químicos individuales.

Algunas sustancias químicas que pueden encontrarse en los TPH incluyen a hexano, combustibles de aviones de reacción, aceites minerales, benceno, tolueno, xilenos, naftalina, y fluoreno, como también otros productos de petróleo y componentes de gasolina. Sin embargo, es probable que muestras de TPH contengan solamente algunas, o una mezcla de estas sustancias químicas. **(8)**

1.1.4.2 Metales Pesados

Los metales pesados son componentes naturales de la corteza de tierra. No pueden ser degradados o ser destruidos. En un grado pequeño se incorporan a nuestros cuerpos vía el alimento, el agua potable y el aire.

Los metales pesados son peligrosos porque tienden a bioacumularse. La bioacumulación significa un aumento en la concentración de un producto químico en un organismo biológico en un cierto plazo, comparada a la concentración del producto químico en el ambiente.

a) El cadmio. Está presente como impureza en varios productos, incluyendo los fertilizantes del fosfato, los detergentes y los productos de petróleo refinados.

b) El plomo. En el ambiente se presenta de fuentes naturales y antropogénicas. Es maleable y dúctil. **(8)**

c) El níquel. El níquel es un elemento bastante abundante, constituye cerca de 0.008% de la corteza terrestre. El níquel se presenta en pequeñas cantidades en plantas y animales. Está presente en pequeñas cantidades en el agua de mar, el petróleo. **(23)**

1.1.4.4 Efectos de los contaminantes en la Salud

Los efectos de contaminantes en la salud de metales pesados (Cd, Ni, Pb) lo podemos apreciar en la siguiente tabla:

Tabla 3.- Impactos de metales pesados en la salud y el ambiente

Metales Pesados	Efectos sobre Ambiente y Salud.
Cadmio	<ul style="list-style-type: none">➤ Daños al sistema inmune.➤ Cuando las concentraciones de Cadmio en el suelo son altas esto puede influir en los procesos del suelo de microorganismos y amenazar a todo el ecosistema del suelo.
Níquel	<ul style="list-style-type: none">➤ Fallos respiratorios.➤ Sabemos que las altas concentraciones de níquel en suelos arenosos puede claramente dañar a las plantas. Microorganismos pueden también sufrir una disminución del crecimiento debido a la presencia de níquel, pero ellos usualmente presentan resistencia de níquel.
Plomo	<ul style="list-style-type: none">➤ Perturbaciones en el sistema nervioso➤ Los organismos del suelo también sufren envenenamiento por Plomo.

Fuente: Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). 1998.

Los efectos de contaminantes de hidrocarburos de petróleo lo podemos apreciar en la siguiente tabla:

Tabla 4.- Impactos de Hidrocarburos de Petróleo en la salud y el ambiente

Contaminantes	Efectos en la salud
TPH	<ul style="list-style-type: none">➤ Pueden afectar el sistema nervioso central.➤ La ingestión de algunos productos de petróleo produce irritación de la garganta y el estomago depresión del sistema nervioso, dificultad para respirar y neumonía.

Fuente: Reseña Toxicológica de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH). Atlanta, GA.

1.2 BIORREMEDIACIÓN DE VEGETACION CONTAMINADA CON HIDROCARBUROS

1.2.1. Vegetación

Cada unidad de vegetación se describe en función de su composición florística, riqueza de especies, estructura y cobertura vegetal.

Tabla 5.- Principales características de las unidades de vegetación.

Tipo de vegetación	Número especies	Cobertura	Especies dominantes
Vegetación de cactáceas	2	20%	Cactáceus del género Cereus
Áreas sin vegetación	0	0%	No se registran especies
Cultivos	17	40 - 60%	Acacia macracantha (Fabaceae), Sulix humboldtiana (Salicaceae)

Fuente: Bioambiental. S.A., Plan de Biorremediación., 11 de septiembre 2007.

1.2.2 Identificación de la cobertura vegetal

El uso actual del suelo en el área de influencia esta representada por bosques secundarios en varios grados de desarrollo se han establecido cultivos permanentes como es el caso del café, plátano, cacao, guabo, guarumo, entre otros. El Bosque primario es muy escaso y en su totalidad a sido remplazado por pasto.

Tabla 6.- Principales especies

BOSQUE SECUNDARIO		BOSQUE PRIMARIO	
Nombre Científico	Nombre Común	Familia	Nombre Común
Inga sp.	Guabo	Moraceae	Moral Bobo
Ficus sp.	Higueron	Melastomataceae	Colca
Apreiba	Peine de	Lauraceae	Canelo
Áspera	Mono		
Cecropia sp.	Guarumo	Euphorbiaceae	Gurango

Fuente: Corena S.A. Corporación para los Recursos Naturales., Diciembre del 2007.

1.2.3 Mejoradores y nutrientes que ayudan en el tratamiento de la vegetación contaminada con hidrocarburos.

1.2.4 Fertilizantes orgánicos.

Existen fertilizantes orgánicos, como el estiércol o el compost, e inorgánicos que se utilizan para suministrar al suelo nitrógeno, potasio y calcio en forma de sales.

➤ Componentes y utilidad.

Hay muchos tipos de fertilizantes y con diferentes proporciones en sus componentes. Los componentes básicos de cualquier fertilizante son nitrógeno, fósforo y potasio.

La diferencia entre unos y otros está en las proporciones utilizadas de cada uno de estos componentes.

➤ Para qué sirven.

Debido a que los contaminantes orgánicos comúnmente no se encuentran en concentraciones suficientes para soportar un proceso de composteo, el material contaminado debe mezclarse con sustancias orgánicas sólidas biodegradables como aserrín, paja, bagazo, estiércol, composta madura y desechos agrícolas. Estos materiales son conocidos como agentes de volumen y se utilizan en el proceso de composteo con tres finalidades básicas: a) asegurar la generación del calor necesario para el proceso; b) mejorar el balance y disponibilidad de nutrientes (C/N) para la actividad microbiana y c)

aumentar la porosidad de la composta y con esto la aireación y capacidad de retención de agua (Alexander 1994, Eweis et al. 1998. Semple et al. 2001). **(5)**

1.3 BIORREMEDIACION

1.3.1 Generalidades

La Biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos (fundamentalmente bacterias, pero también hongos y levaduras) para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples poco o nada contaminantes, con el fin de realizar una mineralización (compuesto blanco $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$), una transformación parcial, la humificación de los residuos o de agentes contaminantes y una alteración del estado redox de metales y, por tanto, se puede utilizar para limpiar terrenos o aguas contaminadas (**Glazer y Nikaido**, 1995). Su ámbito de aplicabilidad es muy amplio, pudiendo considerarse como objeto cada uno de los estados de la materia (**Atlas y Unterman**, 1999). **(10)**

- Sólido: con aplicaciones sobre medios contaminados como suelos o sedimentos, etc.
- Hidrocarburos de todo tipo (alifáticos, aromáticos, PAHs,...).
- Hidrocarburos clorados (PCBs, pesticidas, herbicidas,...).
- Compuestos nitro aromáticos
- Metales pesados: Estos no se metabolizan por los microorganismos de manera apreciable, pero pueden ser inmovilizados o precipitados.

- Otros contaminantes: Compuestos organofosforados, cianuros, fenoles, etc.

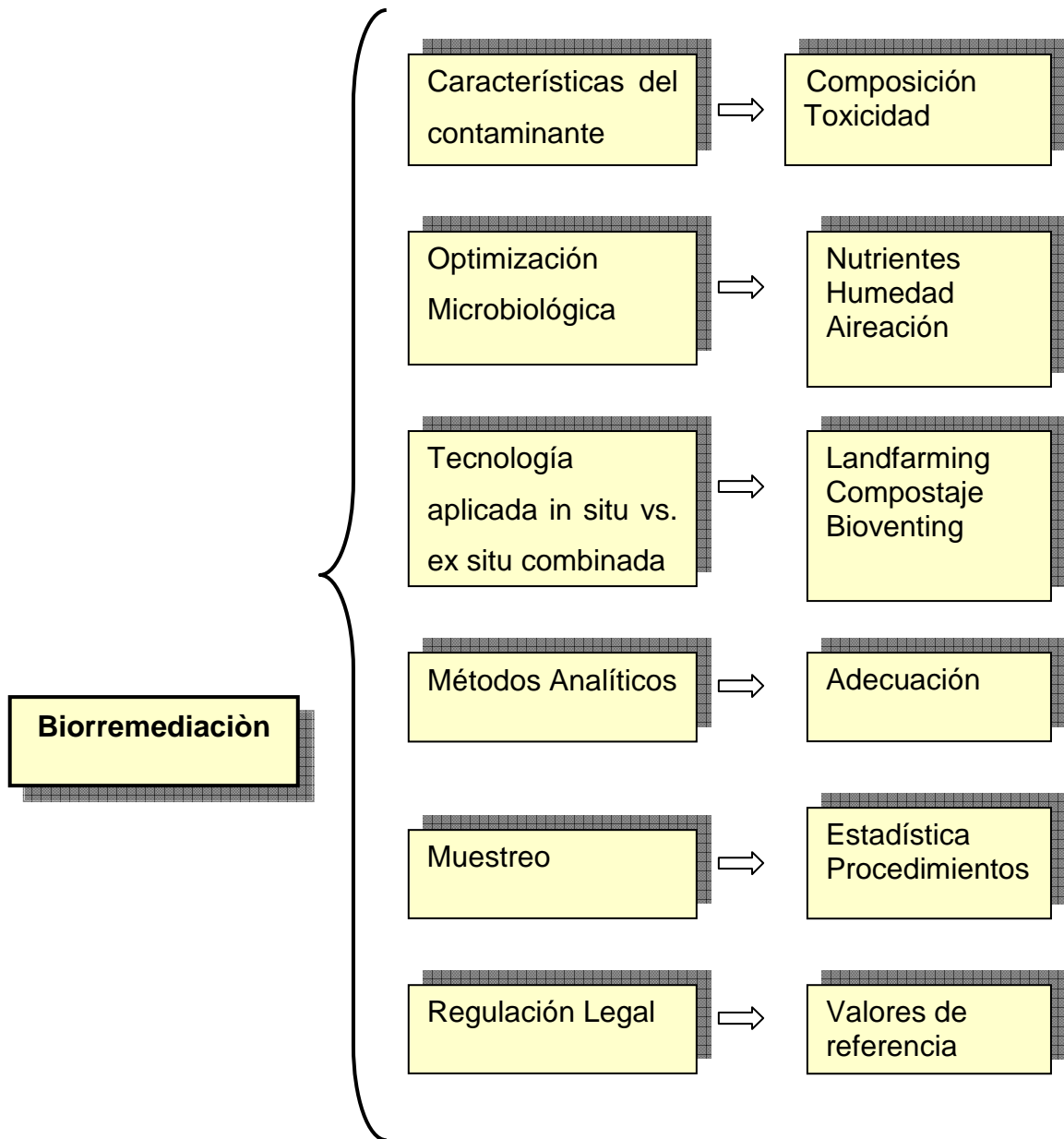


Figura 1. Parámetros implicados en la Biorremediación.

Los parámetros críticos a considerar en un tratamiento biológico son: tipo y concentración de contaminante, concentración de microorganismos, concentración de nutrientes, aireación, condiciones macro ambientales.

➤ **Tipo y concentración de contaminante**

➤ **Tipo de hidrocarburos.** La biodegradabilidad de un compuesto orgánico se debe a que es utilizado por los microorganismos como fuente de carbono. No todos los compuestos se degradan con la misma facilidad (Niemi et al, 1987):

➤ Los compuestos alifáticos de cadena lineal (parafínicos) se degradan fácilmente, las estructuras ramificadas estéricamente inaccesibles para la degradación. De la misma forma, los compuestos alifáticos insaturados se degradan más lentamente que los saturados.

➤ Los compuestos aromáticos simples se degradan por diferentes aperturas del anillo.

➤ Los compuestos nitrogenados y azufrados se degradan lentamente (Niemi et al 1987; Rochkind et al, 1986; Vogel et al, 1987). **(17)**

➤ **Concentración de hidrocarburos.** Cuando la concentración de contaminante es alta puede ocurrir que se produzca inhibición del desarrollo microbiano (disminuya su capacidad de metabolización) o si es muy alta que intoxique a los microorganismos y estos mueran (LaGrega et al, 1996) **.(19)**

➤ **Presencia de microorganismos**

Los microorganismos pueden degradar hidrocarburos y otras sustancias contaminantes en forma de cultivos puros (especie única) o cultivos mixtos

(varias especies que mantienen una relación simbiótica). Para el caso del tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos se requiere una concentración mínima de microorganismos degradadores específicos de 10^3 a 10^4 UFC/g suelo (UFC: unidades formadoras de colonias) y de microorganismos heterótrofos totales de 10^5 a 10^6 UFC/g de suelo. En este caso generalmente no se necesita inoculación. Si esta masa crítica no es suficiente se pueden incorporar microorganismos al suelo mediante inoculación o a través el proceso conocido como bioaumentación. También se puede lograr un incremento importante estimulando la población microbiana existente por incorporación de nutrientes. **(14)**

Bioaumentación. Este proceso implica incrementar drásticamente la masa microbiana del suelo mediante la adición de microorganismos similares a los presentes en el suelo obtenidos mediante cultivo en reactores biológicos.

Cometabolismo. Se da en casos de sustratos complejos donde los microorganismos consumen un compuesto y producen enzimas para transformar otro compuesto, sobre el que no pueden crecer, en uno asimilable por su metabolismo. **(18)**

➤ **Nutrientes**

Los nutrientes son sustancias químicas necesarias para el desarrollo de los microorganismos y se pueden dividir en cuatro grupos: fuentes de Carbono, Fósforo, Nitrógeno y oligoelementos o elementos minoritarios (micronutrientes). La fuente de **Carbono** en nuestro caso es el contaminante, y proporciona el carbono necesario para producir compuestos celulares, productos metabólicos (CO₂, agua, enzimas) y microorganismos (debido a la reproducción de los mismos). 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 que varía según los autores entre 100:10:1 la concentración de hidrocarburo que se toma como referencia y que aporta un 80 % de su masa como carbono al proceso, la velocidad de degradación esperada y un balance de masa del material en tratamiento y del aporte de cada fertilizante del elemento considerado.

La fuente de **Nitrógeno** proporciona el elemento necesario para la producción de aminoácidos y enzimas. Dado que la utilización de estos compuestos es muy rápida los suelos no alcanzan a cubrir todas las necesidades del proceso y deben ser incorporados bajo la forma de fertilizantes de uso agrícola como urea o sulfato de amonio. También se pueden utilizar fertilizantes de origen orgánico como estiércol. **(1)**

La fuente de **Fósforo** interviene en la formación de compuestos energéticos dentro de la célula que se utilizan en los procesos de reproducción y degradación. Dado que la utilización de este compuesto es muy rápida, los

suelos no alcanzan a cubrir todas las necesidades del proceso y deben ser incorporados bajo la forma de fertilizantes de uso agrícola como fosfato diamónico o fosfato tricálcico. También se pueden utilizar fertilizantes de origen orgánico como estiércol. Este parámetro es de importancia crítica para el buen desarrollo del proceso. **(5)**

➤ **Condiciones ambientales.**

➤ **Aireación**

La presencia de oxígeno es importante para la degradación de hidrocarburos, ya que es un proceso aeróbico.

➤ **PH**

El pH del compost es importante para el desarrollo de los microorganismos degradadores, siendo los más adecuados los comprendidos entre 6 y 8. Cuando el pH excede 8 se debe disminuir el mismo mediante adición de azufre al suelo. Si es menor de 6 se puede incrementar mediante la incorporación de carbonato de calcio o hidróxido de calcio al compost. Cuando se encuentran metales pesados en el terreno a muy altas concentraciones se debe trabajar a un pH que mantenga el metal inmovilizado o en forma no soluble (pH alto), para disminuir la toxicidad de los microorganismos.

➤ **Humedad**

El agua es importante para el desarrollo de los microorganismos ya que actúa como medio de transporte de nutrientes y oxígeno a la célula. Es conveniente mantener una humedad del orden del 70 % de la capacidad de campo. Un

exceso de humedad produce inhibición del proceso por anaerobiosis. Un déficit impide el desarrollo de los microorganismos.

➤ **Temperatura**

La temperatura influye en la velocidad de degradación marcadamente, dependiendo del tipo de microorganismos disponibles. Normalmente las temperaturas más adecuadas se encuentran entre 20 ° C y 40 ° C, (los microorganismos que trabajan a estas temperaturas se denominan mesófilos). La velocidad de degradación aumenta con la temperatura, por lo que un incremento de la misma es útil, en los procesos de compostaje en donde se alcanzan temperaturas de 65 ° C. **(2)**

➤ **Presencia de metales y sales**

Los metales y las sales en altas concentraciones intoxican a los microorganismos. En el caso de los metales se puede aumentar el pH del compost para inmovilizarlos y así disminuir la toxicidad sobre los microorganismos. Si se tienen suelos muy contaminados con metales o sales se deberían diluir con suelo limpio para poder llevar a cabo el proceso biológico **(17)**.

1.3.2 Tipos de Biorremediación

En los procesos de Biorremediación generalmente se emplean mezclas de ciertos microorganismos o plantas capaces de degradar o acumular sustancias contaminantes tales como metales pesados y compuestos orgánicos derivados de petróleo.

Básicamente, los procesos de Biorremediación pueden ser de tres tipos:

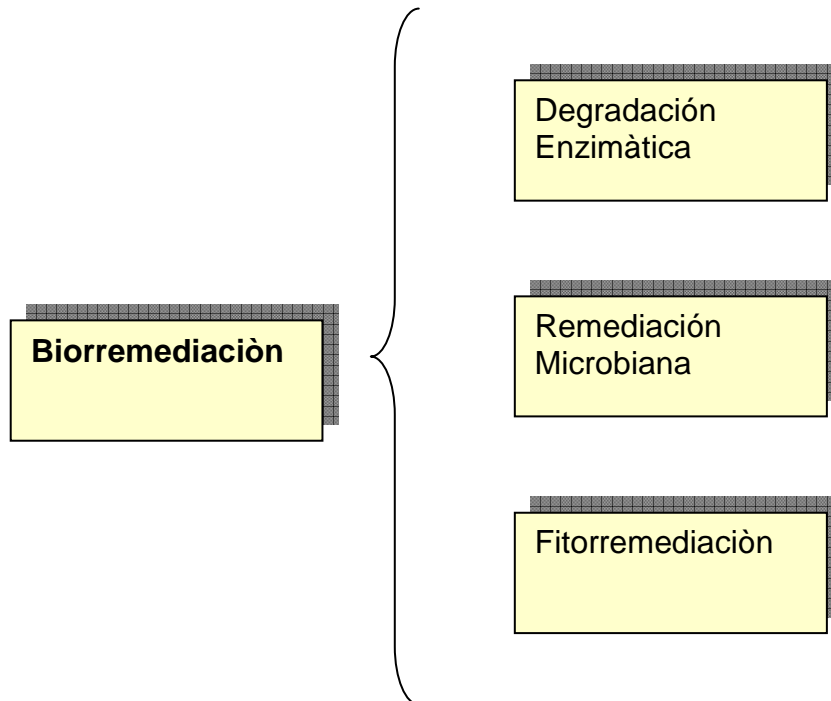


Figura 2. Diferentes modos de Biorremediación

1) Degradación enzimática

Este tipo de degradación consiste en el empleo de enzimas en el sitio contaminado con el fin de degradar las sustancias nocivas. Estas enzimas se obtienen en cantidades industriales por bacterias que las producen naturalmente, o por bacterias modificadas genéticamente que son comercializadas por las empresas biotecnológicas se usan enzimas son utilizadas en tratamientos en donde los microorganismos no pueden desarrollarse debido a la alta toxicidad de los contaminantes.

2) Remediación microbiana

En este tipo de remediación se usan microorganismos directamente en el foco de la contaminación. Los microorganismos utilizados en Biorremediación

pueden ser los ya existentes (autóctonos) en el sitio contaminado o pueden provenir de otros ecosistemas, en cuyo caso deben ser agregados o inoculados. La descontaminación se produce debido a la capacidad natural que tienen ciertos organismos de transformar moléculas orgánicas en sustancias más pequeñas, que resultan menos tóxicas.

Existen, por ejemplo, bacterias y hongos que pueden degradar con relativa facilidad petróleo y sus derivados, benceno, tolueno, entre otros. Los metales pesados como uranio, cadmio y mercurio no son biodegradables, pero las bacterias pueden concentrarlos de tal manera de aislarlos para que sean eliminados más fácilmente. **(11)**

Las actividades microbianas en el proceso de Biorremediación se pueden resumir en el siguiente esquema:

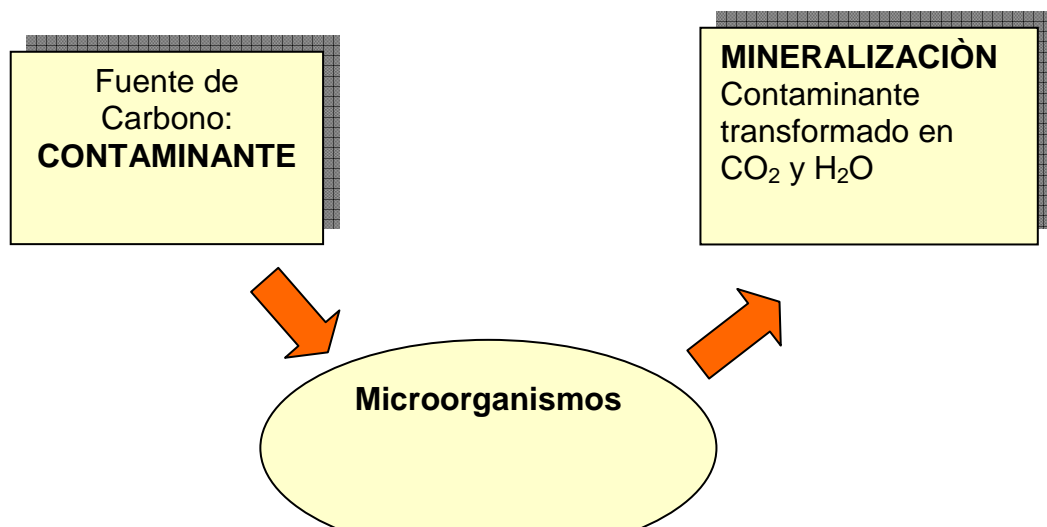


Figura 3 .Metabolismo Microbiano

3) Remediación con plantas (fitorremediación).

La fitorremediación es el uso de plantas para limpiar ambientes contaminados. Aunque se encuentra en desarrollo, constituye una estrategia muy interesante, debido a la capacidad que tienen algunas especies vegetales de absorber, acumular y/o tolerar altas concentraciones de contaminantes como metales pesados.

1.3.3 Tecnologías de Biorremediación.

Existen dos tipos principales de tecnologías de Biorremediación:

➤ **Biorremediación *in-situ*:**

Las técnicas *in situ* buscan estimular y crear un ambiente favorable para el crecimiento microbiano a partir de los contaminantes. Este objetivo generalmente puede lograrse con el suministro de aire u oxígeno (bioventeo), nutrientes (bioestimulación), microorganismos (bioaumentación) y/o humedad, además del control de temperatura y pH (EPA, 2001).

➤ **Biorremediación *ex-situ*:**

Los procesos de Biorremediación ex situ, incluyen: (i) procesos de biodegradación en fase de lodos, en donde el suelo se mezcla con agua (para formar un lodo), microorganismos y nutrientes; y (ii) de biodegradación en fase sólida, en donde los suelos colocan en una celda de tratamiento (composteo) o sobre membranas impermeables (biolabranza), en donde se agrega agua y nutrientes (EPA, 2001) **(13)**.

1.3.4 Fundamento bioquímico de la biodegradación

El fundamento bioquímico de la Biorremediación se basa en que en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, va a producir una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía.

La cadena la inicia un sustrato orgánico (compuestos hidrocarburos) que es externo a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia.

Los aceptores más comúnmente utilizados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio. **(9)**

Degradación aerobia:



Degradación anaerobia:

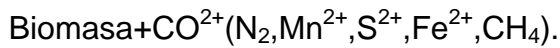


Figura 4. Degradación aerobia y anaerobia.

Tabla 7. Capacidad de biodegradación

Alta biodegradabilidad	Intermedia biodegradabilidad	Baja biodegradabilidad
Fracción de los alcanos, incluye alcanos normales, alcanos ramificados.	Compuestos aromáticos e hidrocarburos policíclicos aromáticos. Estos compuestos son los de mayor importancia debido a su toxicidad y tendencia a la bioacumulación.	Fracción polar que son las resinas (piridinas, quinolinas, carbazoles, sulfóxidos y amidas) y asfaltenos (fenoles, ácidos grasos, cetonas, ésteres y porfirinas)

1.3.5 El composteo como estrategia de Biorremediación.

1.3.5.1 Composteo.

El compostaje o "composting" es el proceso biológico aeróbico, mediante el cual los microorganismos actúan sobre la materia rápidamente biodegradable (restos de cosecha, excrementos de animales y residuos urbanos), permitiendo obtener "compost", abono excelente para la agricultura.

El compost o mantillo es el resultado de un proceso de humificación de la materia orgánica, bajo condiciones controladas y en ausencia de suelo. El compost es un nutriente para el suelo que mejora la estructura, ayuda a reducir la erosión y ayuda a la absorción de agua y nutrientes por parte de las plantas.

El composteo es un proceso biológico controlado, por el cual los contaminantes orgánicos pueden convertirse en subproductos inocuos estables. El material contaminado se mezcla en pilas, con sustancias orgánicas sólidas biodegradables, como paja, aserrín, estiércol y desechos agrícolas. Se ha usado con éxito, para la remediación de suelos contaminados con clorofenoles, gasolina, HTPs, HAPs (Van Deuren y col., 1997; Semple y col., 2001).

1.3.5.2. Factores que condicionan el proceso de compostaje

El proceso de compostaje se basa en la actividad de microorganismos que viven en el entorno, ya que son los responsables de la descomposición de la materia orgánica. Para que estos microorganismos puedan vivir y desarrollar la actividad descomponedora se necesitan unas condiciones óptimas de temperatura, humedad y oxigenación. Los factores más importantes son:

- **Temperatura.** Las pilas de compost son eficientes en rangos de temperatura entre 30 a 40 °C (mesofílicos).
- **Humedad.** En el proceso de compostaje es importante que la humedad alcance unos niveles óptimos del 40-60 %. Si el contenido en humedad es mayor, se produciría una putrefacción de la materia orgánica. Si la humedad es baja se disminuye la actividad de los microorganismos y el proceso es más lento.
- **pH.** Influye en el proceso debido a su acción sobre microorganismos. En general los hongos toleran un margen de pH entre 5-8, mientras que las bacterias tienen menor capacidad de tolerancia (pH = 6-7,5).
- **Oxígeno.** El compostaje es un proceso aeróbico, por lo que la presencia de oxígeno es esencial.
- **Relación C/N equilibrada.** Estos materiales son adicionados como agente de volumen, para mejorar el balance de nutrientes (C/N) para la actividad microbiana, y para asegurar la generación del calor necesario para el proceso.
- **Población microbiana.** El compostaje es un proceso aeróbico de descomposición de la materia orgánica, llevado a cabo por una amplia gama de poblaciones de bacterias, hongos y actinomicetes.

1.3.5.3 El proceso de compostaje.

El proceso de composting o compostaje puede dividirse en cuatro períodos, atendiendo a la evolución de la temperatura:

- **Mesolítico.** La masa vegetal está a temperatura ambiente y los microorganismos mesófilos se multiplican rápidamente. Como consecuencia de la actividad metabólica la temperatura se eleva y se producen ácidos orgánicos que hacen bajar el pH.

- **Termofílico.** Cuando se alcanza una temperatura de 40 °C, los microorganismos termófilos actúan transformando el nitrógeno en amoníaco y el pH del medio se hace alcalino. A los 60 °C estos hongos termófilos desaparecen y aparecen las bacterias esporígenas y actinomicetos. Estos microorganismos son los encargados de descomponer las ceras, proteínas y hemicelulosa.

- **De enfriamiento.** Cuando la temperatura es menor de 60 °C, reaparecen los hongos termófilos que reinvasen el mantillo y descomponen la celulosa. Al bajar de 40 °C los mesófilos también reinician su actividad y el pH del medio desciende ligeramente.

- **De maduración.** Es un periodo que requiere meses a temperatura ambiente, durante los cuales se producen reacciones secundarias de condensación y polimerización del humus.

1.3.5.4 Tipos de sistemas de compostaje:

Hay tres tipos, hileras, pilas estáticas y reactores cerrados. La forma de aireación es lo que diferencia a las pilas estáticas de las hileras, las hileras son aireadas por volteo mientras las pilas estáticas se introducen aireación forzada.

Hileras (biopilas alargadas)

Se apila el material ya mezclado con los agentes esponjantes y los nutrientes si son necesarios, formando hileras, el alto y ancho de las mismas debería ser suficiente para permitir que el calor generado en el proceso metabólico sea mayor al disipado. El ancho se sitúa normalmente entre 3 y 4 m, mientras que la altura puede llegar a 1.2 y 1.5 m.

El método de aireación depende en cierta medida del tamaño de la hilera, la frecuencia del volteo depende de los objetivos a lograr, a veces es una vez al día, una cada mes o nunca. Como se dijo el volteo ayuda a mantener una temperatura homogénea en todo el material que forma la pila.

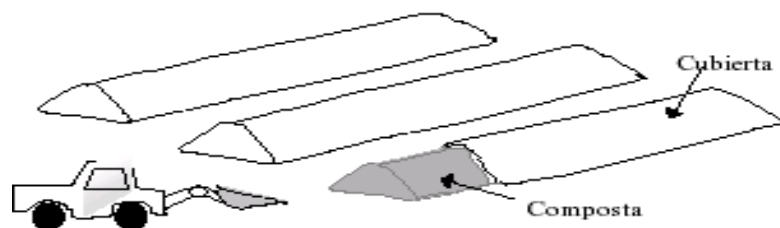


Figura 5 .Representación esquemática de un sistema de biopilas alargadas

b) Pilas estáticas

El material mezclado se coloca sobre un sistema de tubos perforados conectados a un soplete o bomba de vacío. La aireación de las pilas puede lograrse mediante aire forzado o por vacío.

En pilas profundas se utilizan redes de tubos a diferentes alturas para la aireación y para el aporte de humedad y nutrientes. Las pilas pueden ser de 3 hasta 6 metros de altura.

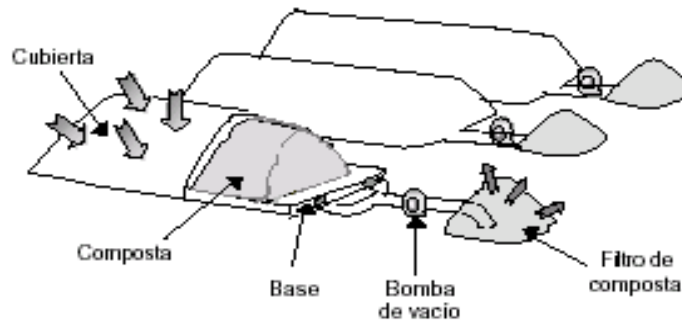


Figura 6. Representación esquemática de un sistema aireado de biopilas estáticas.

c) Reactores cerrados.

Tiene altos costos de inversión pero proporcionan el mayor control del proceso. Se equipan con mecanismos combinados para permitir frecuentes o continuas mezclas de los residuos. La mezcla mejora la distribución de los contaminantes y permite mayor contacto entre los microorganismos, los productos químicos, incrementando el potencial de la biodegradación. **(21)**

1.3.5.5. Tipos de compost.

- **De maleza.** El material empleado es vegetación de sotobosque, arbustos .Se utiliza como acolchado o “mulching”.
- **De maleza y broza.** Similar al anterior, pero al que se le añade broza (restos de vegetación muertos). Es un compost de cobertura.
- **De material vegetal con estiércol.** Procede de restos de vegetales, malezas, plantas aromáticas y estiércol de équidos o de pequeños rumiantes. Este tipo de compost se incorpora al suelo en barbecho.

1.3.6 Biorremediación por bioestimulación

Con la bioestimulación o biorremediación acelerada lo que se pretende es acelerar el proceso de biodegradación natural proporcionando nutrientes y/o nuevos microorganismos a una zona contaminada con compuestos orgánicos para proceder a su transformación en compuestos inofensivos.

Este es el proceso mediante el cual, los microorganismos (bacterias, hongos...) autóctonos o inoculados de una zona, degradan (metabolizan) los contaminantes orgánicos presentes en la misma. Para que los microorganismos (principalmente las bacterias) puedan eliminar las sustancias químicas dañinas, el compost debe tener la temperatura, los nutrientes y la cantidad de oxígeno apropiados. Esas condiciones permiten que los microorganismos crezcan y se multipliquen, y asimilen más sustancias químicas. **(18)**

Desde un punto de vista metodológico, que determinan a su vez otras tantas aproximaciones principales a la Biorremediación son los siguientes:

Atenuación natural

Se denomina Biorremediación intrínseca o atenuación natural, a la que sobre muchos compuestos orgánicos se lleva a cabo por los microorganismos

autóctonos, principalmente bacterias, del medio afectado (**Rosenberg y Ron, 1996**):

La capacidad intrínseca de asimilación de un medio depende, de las “habilidades metabólicas” de los microorganismos nativos, del tipo de contaminante y, lógicamente, de la geoquímica y la hidrogeología en la zona.

Factores que limitan la atenuación natural

Hay bastantes factores que pueden limitar o impedir la atenuación natural en un medio contaminado; algunos de ellos ya los hemos apuntado (**King et al., 1997**):

- Carencia de nutrientes esenciales para los microorganismos (por ejemplo, nitrógeno y/o fósforo).
- Ausencia de aceptores adecuados de electrones (generalmente oxígeno).
- Inexistencia de condiciones medioambientales apropiadas (pH, potencial redox, humedad, temperatura).
- Ausencia de poblaciones microbianas con el potencial enzimático adecuado necesario para degradar los contaminantes.
- Presencia de componentes tóxicos en la mezcla contaminante. **(1)**

1.3.7 Límites Permisibles

Los límites permisibles de los parámetros a analizar en un determinado proyecto dependen del uso posterior a darse al suelo remediado. El monitoreo consistirá de una caracterización inicial del sitio y/o material a remediarse, un

monitoreo de por lo menos un muestreo con los respectivos análisis cada seis meses, y una caracterización final una vez concluidos los trabajos. (6)

1.3.7. Ventajas y desventajas de la Biorremediación

Ventajas:

- Generalmente sólo origina cambios físicos menores sobre el medio
- Cuando se usa correctamente no produce efectos adversos significativos
- Puede ser útil para retirar algunos de los compuestos tóxicos del petróleo
- Ofrece una solución más simple y completa que las tecnologías físico-químicas. Es menos costosa que otras tecnologías

Desventajas

- Su implementación es específica para cada lugar contaminado
- Su optimización requiere información sustancial acerca del lugar contaminado y las características del vertido. (22)

Tabla 8: Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en la industria hidrocarburiífera.

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

Fuente: Reglamento Ambiental (RAOHE).D. E.1215.

- 1) Expresado en base de sustancia seca (gravimétrico; 105⁰C, 24 horas).
- 2) Valores permisibles enfocados en la protección de suelos y cultivos

1.4 Bacterias

1.4.1 Generalidades

Las bacterias son organismos unicelulares que no están clasificados entre los animales ni entre las plantas, sino que pertenecen al reino **Moneras**. Es el reino más primitivo, agrupa a organismos procariotas que **carecen de un núcleo rodeado por membranas** y de organelas.

Las bacterias vistas al microscopio generalmente aparecen como esferas o como bastones rectos o curvos. La longitud promedio de la célula bacteriana es aproximadamente 5 micras.

Las bacterias pueden clasificarse, atendiendo a su forma, en cocos (esféricas), bacilos (bastones rectos) y espirilos (bastones curvos). Otra forma de clasificar las bacterias es aerobia, las que necesitan aire para vivir, anaerobia, que no pueden vivir en presencia de aire y por último, aquella que indiferentemente pueden vivir con aire o sin éste.

Dependiendo de la fuente de carbono que utilizan, los microorganismos se pueden clasificar en:

- **Autótrofos:** si es el CO₂ atmosférico (microorganismos que fotosintetizan).
- **Heterótrofos** si se utilizan carbono orgánico.

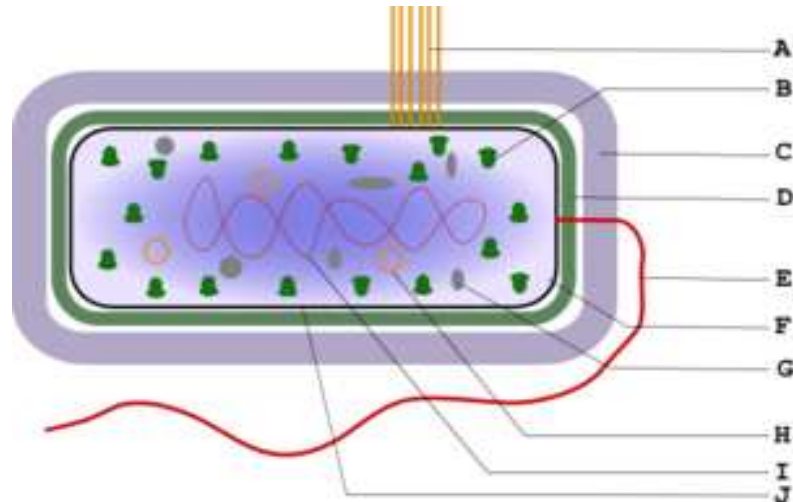


Figura 7. Estructura de la célula bacteriana.

- A-Pili
- B-Ribosomas
- C-Cápsula
- J-Membrana citoplasmática.
- D-Pared celular
- E-Flagelo
- F-Citoplasma
- G-Vacuola
- H-Plásmido
- I-Nucleoide

Hay varios **tipos de microorganismos** en función de sus temperaturas de crecimiento mínima, máxima y óptima

Tabla 9.- Grupos de microorganismo según su temperatura

Grupo	Temperatura mínima (°C)	Temperatura óptima (°C)	Temperatura máxima (°C)
Psicrófilo	0-5	20-35	25-40
Mesófilo	5-20	30-45	40-50
Termófilo	35-45	45-70	60-80

Fuente: Freeman, Bob A; Microbiología de Burrows 22a Edición, Editorial Interamericana, España 1986. Pags. 57-62.

1.4.2 Microorganismos degradadores de petróleo.

Los llamados organismos hidrocarburoclásticos son bacterias y hongos capaces de degradar petróleo fisiológica y metabólicamente.

Distinguimos principalmente tres grupos de microorganismos:

- 1) Bacterias: existen numerosos géneros de bacterias capaces de degradar hidrocarburos, pero de ellos destacamos el género *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter* o *Bacillus* entre otros, por poseer los anteriores el mayor número de especies con esta capacidad.
- 2) Hongos: igualmente encontramos varios géneros de hongos capaces de degradar hidrocarburos, destacando en este caso los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Candida* (este último dentro de las levaduras).
- 3) Algas microscópicas: fundamentalmente cianobacterias.

En ecosistemas no contaminados, los microorganismos degradadores de hidrocarburos constituyen menos del 0,1% de la comunidad microbiana; mientras que en ecosistemas contaminados con hidrocarburos pueden constituir el 100% de la comunidad microbiana.

Las poblaciones dominantes en estas comunidades poseen características nutricionales relacionadas al contaminante y pueden ser también resistentes a muchas formas de estrés ambiental. Cuando la fuente de carbono es un substrato insoluble como un hidrocarburo, los microorganismos facilitan su

difusión hacia la célula produciendo sustancias como carbohidratos, ácidos grasos, enzimas y biosurfactantes. Los microorganismos utilizan estos compuestos a manera de un biofilm alrededor de la molécula del hidrocarburo, para posteriormente ingerirlo o romperlo en compuestos simples de carbono y oxígeno. Estos microorganismos usan la energía liberada para manejar los procesos termodinámicamente no espontáneos como la síntesis de componentes celulares. **(16)**

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Lugar Experimental

El área de trabajo se encuentra localizada en la parte posterior de la Bodega Central del Campamento Guarumo de Petroproducción, en donde existe un terreno destinado para este tipo de investigaciones como es Biorremediación.

El Campamento se halla ubicado a dos kilómetros al este de la población de Pacayacu, Parroquia Pacayacu, Cantón Lago Agrio, Provincia de Sucumbíos, se encuentra en las coordenadas 325417 E y 9994338 N; a 265 m.snm.

2.1.2 Materiales Experimentales

2.1.2.1 Vegetación contaminada con Petróleo

La muestra de vegetación contaminada con petróleo fue en el mes de Noviembre del 2007, en un derrame de crudo por corrosión de la línea de flujo del pozo Shuara 09, aledaño a la entrada estación Shuara. La vegetación contaminada proveniente de un área (aproximadamente 210 m²) fue trasladada al lugar para el cual fue diseñado para su posterior tratamiento.

2.1.2.2 Sustratos

- Bagazo de caña.
- Aserrín
- Hojas de guaba
- Estiércol

2.1.2.3 Bacterias de la zona

Para el presente trabajo los microorganismos no fueron manipulados genéticamente, se logró realizar una activación de los mismos proporcionándoles (bioestimulación), los cuales unos meses después de terminado el tratamiento y habiendo sido metabolizados por los agentes microbianos, volverán a su nivel normal y de esta forma también los microorganismos retomarán su nivel de equilibrio poblacional.

Se realizó el monitoreo de microorganismos totales por conteo luego de 48 horas de incubación sobre agar PCA (Plate Count Agar).

2.1.3 Materiales de laboratorio

Tabla 10. Materiales, Reactivos.

MATERIALES	REACTIVOS	CANTIDAD
Balones de aforo de 100 ml	Acido Bórico 2%.	25ml
Espátula	Ácido Clorhídrico 0.002 N.	
Filtros whatman sin ceniza whatman sin ceniza 4	Agua destilada	
Fundas de polietileno	Acido Nítrico Concentrado	10ml
Guantes desechables.	Acido Sulfúrico	10 ml
Mascarilla	Freòn Destilado	300 ml
Molino eléctrico	Hidróxido de sodio al 33%.	
Papel filtro	Selenio	Pizca
Papel aluminio estéril	Silica Gel	0,6 g
Placas para recuento de aerobios.	Sodio Bicarbonato 0.5 N.	50ml
Peras	Sulfato de sodio (anhidro).	1.5 g
Pipeta volumétrica de 1 ml.	Peptona	9 ml

Pipeta graduada de 10 ml	Phosver en sachet	18
Pipetas estériles		
Pinza metálica		
Probeta de 250 ml		
Tubos de digestión		
Tubos de ensayo con tapa rosca		
Vasos de precipitación de 50 ml		
Varilla de agitación		
Vidrios reloj		

Tabla 11. Equipos Utilizados

EQUIPOS	CÒDIGO	MARCA
Agitador de Tubos	EI/10-02	Branstead
Agitador calentador magnético	EI/25	Thermolyne
Balanza electrónica digital.	EI/	
Baño Ultrasonido	EI/67	Cole-Parmer
Cabina de almacenaje para solvente	EI/15-01	Labconco
Cámara de flujo laminar		
Cromatografía de Gases	EI/50-00	Shimadzu
Destilador de Kjeldhal	EI/20	Gerhardt
Depurador	EI/17	Gerhardt
Digestor	EI/16-00	Gerhardt
Estufa pequeña	EI/35	Cautiòn
Estufa de convección mecánica	EI/58	Bacostead
Espectrofotómetro	EI/24-00	HACH
Incubadora		
Mufla		
pH metro	EI/59	Orionstar

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Muestreo

2.2.1.1 Recolección del material contaminado (Campo)

El derrame fue localizado en la línea de flujo del pozo Shuara 09 ocasionada por corrosión interna, el área de afectación fue de 210 m². En el muestreo el objetivo es obtener muestras representativas que deberán cubrir toda el área contaminada y son de carácter simple y puntual.

Se trazó una cuadrícula extendida sobre toda el área afectada. Las líneas de la cuadrícula deben estar distantes una de la otra 3 metros tal como se muestra en el diagrama. En el cual se procedió a realizar un muestreo al azar de vegetación contaminada con petróleo y se llevó todo este material recolectado al centro de acopio para su posterior tratamiento Campamento Guarumo-Petroproducción.

En el centro de tratamiento se realizará un muestreo compuesto del contaminante las mismas serán llevadas a laboratorio en fundas plásticas impermeabilizadas (250g) para su posterior análisis físico- químico.

Se escogió este tipo de muestreo porque el área es irregular.

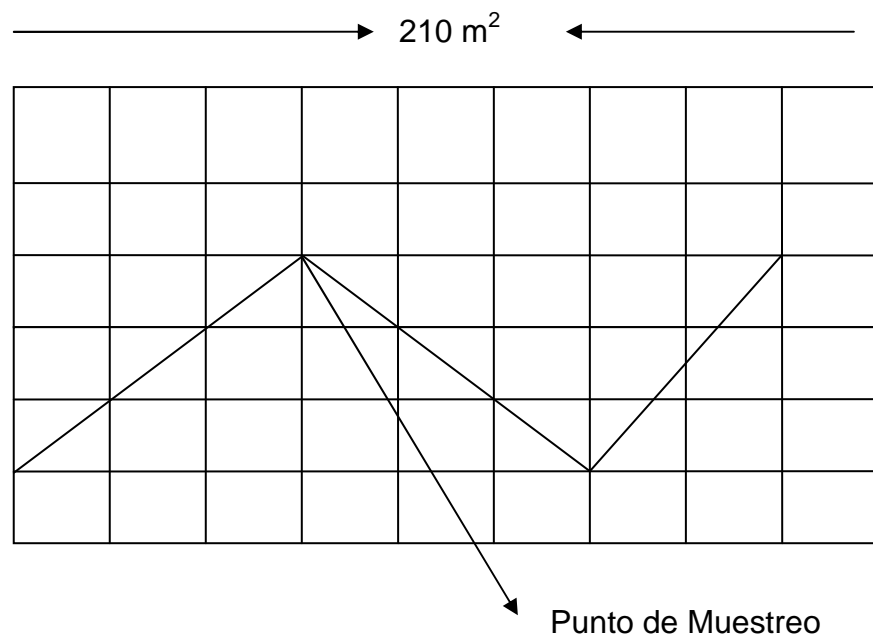


Figura 8. Esquema de la grilla de muestreo

La vegetación recolectada de cada uno de los puntos de muestreo fue colocada en una lona para su mezclado y homogenización, se procederá hacer el compost. Este se llevará al área destinada para el tratamiento, localizada en la parte posterior de la Bodega Central del Campamento Guarumo de Petroproducción.

La muestra específica de muestreo que se debe emplear en cada caso depende de las condiciones ambientales, características y estado del contaminante, sustrato sobre el que se encuentre depositado y factores de origen ambiental que hayan sido incorporados.

2.2.1.2 Análisis de muestra (Laboratorio)

Para realizar los análisis de laboratorio se procedió a realizar un muestreo compuesto el mismo que consiste en homogenizar la muestra sobre papel filtro y realizar un cuarteo de la vegetación contaminada de las cuales se toma las dos partes diagonales para repetir este procedimiento de esta manera se obtendrá una muestra representativa.

2.2.1.3. Descripción de la tecnología a aplicarse

2.2.1.3.1 Metodología

El presente trabajo de investigación, se inicio con la recolección del desbroce de vegetación contaminada con petróleo y se dio por terminado cuando los análisis de laboratorio (TPH y metales pesados), dieron valores inferiores a los límites exigidos en el Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador, Decreto Ejecutivo 1215, de acuerdo a la Tabla 6: Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicios, para suelos de uso agrícola.

1. Toma de muestras compuestas
2. Limpieza de los residuos orgánicos
3. Preparación del área de tratamiento

4. Tratamiento de los desechos orgánicos (Compostaje)
5. Tratamiento del material
6. Disposición en pilas de tratamiento.
7. Oxigenación y homogenización.
8. Monitoreo y control analítico del proceso.
9. Evaluación del proceso.
10. Disposición final de desechos.

Tabla 12. Métodos de análisis procedimiento laboratorio

ÍTEM	ANÁLISIS	UNIDAD	PROCEDIMIENTO	MÉTODO DE REFERENCIA	METODOLOGIA EQUIPO USADO
1	Muestreo				Muestra compuesta y representativa, homogenización

2	pH			EPA SW-846 1311, PEE-AG- 01	Extracción bajo condiciones estándares, determinación potenciométrica
3	Conductividad d eléctrica	Us/cm		EPA SW-846 1311, PEE-AG- 02	Extracción bajo condiciones estándares, determinación conductivimétrica
4	Cadmio	mg/kg	SW-846- 3050B/7130Cd	SW-846- 3050B/7130 Cd	Digestión ácida, filtración y determinación por espectroscopia de absorción atómica.
5	Níquel	mg/kg	SW-846- 3050B/7520 Ni	SW-846- 3050B/7520 Ni	Digestión ácida, filtración y determinación por espectroscopia de absorción atómica.
6	Plomo	mg/kg	SW-846- 3050B/7420 Pb	SW-846- 3050B/7420 Pb	Digestión ácida, filtración y determinación por espectroscopia de absorción atómica
7	TPH	mg/kg	PEE/LABPAM/SS /01	EPA 413,1;1664; Publicación 0 ECY 97-602	Extracción con freón y determinación por espectrofotometría a infrarrojo
8	Nitrógeno Global	mg/L	APHA/AWWA WEF 4500-NH3		Destilador Kjeldhal y titulación
9	Fósforo	mg/L	HACH 8048		Formación complejo coloreado y lectura mediante espectrofotometría UV/VIS

2.2.2. Métodos Analíticos

2.2.2.1. Determinación de Temperatura

1. Principio:

1.1. Normalmente las medidas de Temperatura pueden realizarse con cualquier termómetro Celsius de mercurio, que como mínimo deberá tener una escala con marcos cada 0.1 °C sobre el tubo capilar y una capacidad mínima que permite equilibrio rápido.

1.1. Alternativa determinación con sensor de Temperatura.

2. Referencia:

2.1 PHA/AWWA/WEF Standard Methods N^o B2250.

2.2.2.2. Determinación de humedad

1. Principio

Se entiende por la cantidad de agua presente en el suelo y se determina por desecamiento en la estufa a 100-105 °C hasta obtener un peso constante.

2.2.2.3. Determinación de Aerobios Mesòfilos

1. Método

El método se basa en incubar en agar de recuento en placa, a 35°C y durante 48 hrs., volúmenes medidos de diferentes diluciones de la muestra, y contar el número de colonias producidas para determinar el número de gérmenes viables o unidades formadoras de colonias por gramo de muestra

1. Referencia

ISO 4833,2003

2.2.2.4 Determinación de Potencial de Hidrógeno

1. Principio

1.1. Disolución del suelo contaminado en agua destilado y determinación mediante un medidor de pH que conste de un potenciómetro, un electrodo de

vidrio, un electrodo de referencia y un dispositivo para compensar la Temperatura, confiable y reproducible.

2.2.2.5 Determinación de Hidrocarburos Totales

1. Principio

1.1. Extracción con freón y determinación por espectrometría infrarrojo.

2. Referencia:

2.1 EPA 413.1; 1664; Publicación N° ECY 97-602.

2.2.2.6 Determinación de metales pesados (Cd, Ni, Pb)

Cadmio

1. Principio

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

2. Referencia:

SW-846-3050B/7130 Cd.

Níquel

1. Principio

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

2. Referencia:

2.1 SW-846-3050 B/7520 Ni.

Plomo

1. Principio

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

2. Referencia:

2.1 SW-846-3050B/7420 Pb.

2.2.2.7 Determinación del Nitrógeno global

1. Principio

1.1 Destilador kehndjal y titulación

2. Referencia:

2.1 APHA/AWWA WEA 4500-NH3.

2.2.2.8 Determinación del Fósforo

1 Principio

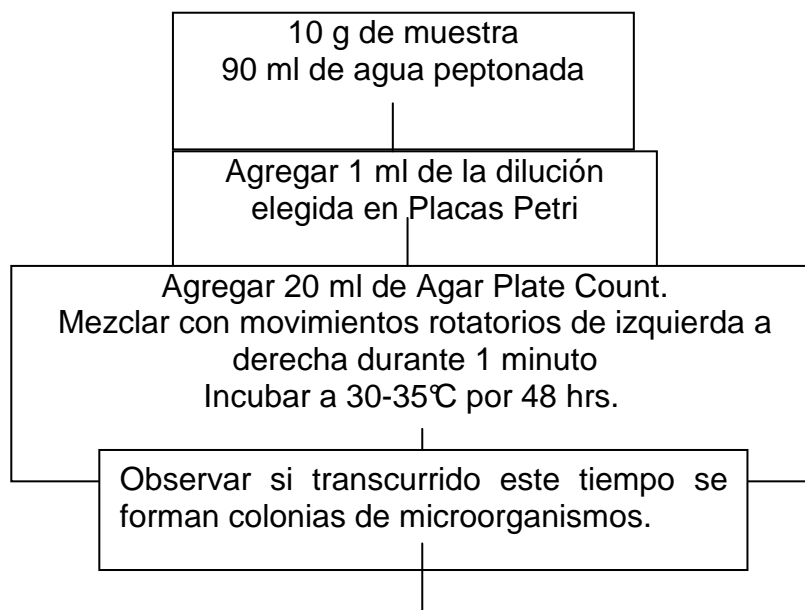
1.1 Formación del complejo coloreado y lectura mediante espectrofotometría UV/VIS.

2. Referencia:

2.1 APHA, AWWA. Método 4500-P E.

2.2.2 Metodología del Recuento de Aeróbios Mesòfilos

2.2.3.1. Preparación de la Técnica



Informar como:
$$\text{UFC/g} = x (\text{prom}) \times (1/\text{inóculo}) \times 10$$

2.3. Diseño experimental

La vegetación contaminada en el área de afectación fue (210 m²) fue distribuida en partes iguales en cada parcela para recibir el tratamiento correspondiente.

Para el desarrollo de la presente investigación, se la realizó mediante una técnica de compost para lo cual surgió la necesidad de construir un cubeto de 18m x 8m delimitada por un muro de tierra de 0.50 m de altura y rodeada por un canal perimetral que dirige las aguas lluvias y probables lixiviados de hidrocarburos a un sumidero impermeabilizado con geomembrana y provisto de un tubo con cuello de ganso, está fue dividida en 18 parcelas, las cuales contienen partes iguales de vegetación contaminada con hidrocarburos. (Ver fotografía N^o1).

La investigación consistió en llevar a cabo una valoración de una técnica biológica para vegetación contaminada con hidrocarburos, se trabajo con seis tratamientos con tres réplicas de cada uno, lo que da un total de 18 parcelas.

En la Figura N^o 2 se puede apreciar la distribución de las 18 unidades experimentales, identificadas con sus respectivos códigos: T₁ – T₆ y las réplicas a₁, a₂, a₃; b₁, b₂, b₃. La ubicación de las parcelas se las realizó al zar.

Además se puede apreciar en la figura la distribución de parcelas, se colocó un blanco de esa manera se podrá comparar con los parámetros que se medirán en la vegetación contaminada.

2.3.1 Metodología

2.3.1.1. Tipo de Diseño

En nuestra investigación se ve la necesidad de trabajar con un diseño experimental conocido como diseño de doble vía, se aplica cuando el material es heterogéneo las unidades experimentales homogéneas se agrupan formando grupos homogéneos llamados bloques. Al utilizar este tratamiento adicional se obtiene una información complementaria que permite determinar con mucha claridad los resultados y de esa manera llegar a conclusiones más valederas luego de haber realizado el experimento.

2.3.1.2. Modelo Matemático

Entonces, cada respuesta experimental puede expresarse por el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = u + B_i + T_j + E_{ij}$$

$$i = 1, 2, \dots, t$$

$$j = 1, 2, \dots, r$$

Donde:

Y_{ij} = observaciones en el i-ésimo bloque y j-ésimo tratamiento

u = promedio global para todas las observaciones

B_i = efecto del i-ésimo bloque

T_j = efecto del j-ésimo tratamiento

E_{ij} = error aleatorio

2.3.1.3. Factores de estudio tratamientos y réplicas.

En nuestro trabajo vamos a tomar 3 muestras por cada tratamiento en total tendremos 18 muestras, debido a que son 6 tratamientos lo que vamos a realizar con 3 réplicas a excepción del blanco.

Se probarán 6 variantes de tratamiento con 3 repeticiones para evitar errores, por esto es que se dividirán 18 subparcelas y un Blanco o Testigo en total tendríamos 19 subparcelas a las mismas que se suministraba agua una vez al día también aireando durante toda la fase experimental con el propósito de mantener condiciones aerobias.

2.3.1.4. Preparación de tratamientos

La vegetación contaminada con petróleo contiene partes iguales 181,81 kg de material contaminado.

La vegetación contaminada con hidrocarburo de 3272,58 kg (100%), se combinó con nutrientes y los acondicionadores de acuerdo a los tratamientos.

Los tratamientos aplicados fueron: T₁ (75% Mo+25% A), T₂ (55% MO+45% A), T₃ (45%MO+55% A), T₄ (25% Mo+75% A), T₅ (35% MO+65% A), T₆ (40% MO + 60% A).

Las unidades experimentales (bioceldas) se mantuvieron en temperatura ambiente, por el exceso de lluvias se construye un techo de plástico con base de caña, para ayudar al proceso de biodegradación se dio aireación manual 4 veces por semana para lograr la mayor soltura de la vegetación, a los 30 días de iniciado el proceso de biorremediación se tritura el material contaminado cada 15 días en adelante durante los 6 meses, se adiciona los porcentajes correspondientes de cada tratamiento, nutrientes(desechos orgánicos vegetales) y acondicionador(absorbente), con la finalidad de bioestimular la población microbiana.

Figura 9. Ubicación de tratamientos y repeticiones.



T₁M₁N₁p₁	T₂M₁N₂p₁	T₄M₁N₂p₃	T₅M₃N₁p₂	T₄M₂N₂p₁	T₃M₂N₂p₂	T₆M₃N₂p₂	T₁M₁N₁p₂	T₅
T₃M₂N₁p₁	T₆M₃N₂p₁	T₁M₁N₁p₃	T₂M₁N₂p₂	T₄M₂N₂p₂	T₅M₁N₂p₃	T₂M₁N₂p₃	T₃M₁N₂p₃	T₆

BLANCO

T = Tratamientos

M = Maleza contaminada

N = Materia orgánica

P = Parcelas

2.3.1.5. Parámetros de Control

Es imprescindible tomar en cuenta los parámetros de control durante toda la Biorremediación (seis meses) a continuación se detallan en la Tabla 13.

Tabla 13. Parámetros de Control

Análisis	Parámetros de control	Unidad
Físicos	pH	⁺ H
	Temperatura	⁰ C
	Humedad	%
	Aireación	-----
Microbiológicos	Aerobios Mesófilos	UFC/g

2.3.1.6. Parámetros de medición

Los parámetros a medir de cada una de las unidades experimentales nos permiten comparar con los límites permisibles de RAOHE, de esta manera se determinará si ha disminuido los niveles de contaminación en la vegetación impregnada con hidrocarburos. Se detalla a continuación los diferentes parámetros a medir en la Tabla 14.

Tabla 14. Parámetros de Medición.

Análisis	Parámetros de medición.	Unidad
Químicos (cada 30 días)	TPH	mg/kg.
	Níquel	mg/kg
	Cadmio	mg/kg
	Plomo	mg/kg

El efecto de 6 tratamientos se determinará mediante una matriz o tabla de doble entrada con las combinaciones de los tratamientos y réplicas 6 tratamientos y 3 réplicas en cada tratamiento. De esta forma el cálculo parte determinando la suma de cuadrados total, de los tratamientos, de las replicaciones, y del residuo como si se tratara de un diseño de bloques. Las respuestas experimentales serán consideradas mediante el análisis de varianza.

En la tabla 15 se muestra la matriz de respuestas experimentales.

Tabla 15. Representación generalizada de las repuestas experimentales en un diseño de bloques.

Bloques Tiempo (Meses)		Tratamientos						Total de bloque s	Medias
		T1	T2	T3	T4	T5	T6		
1	R ₁	Y ₁₁₁	Y ₁₂₁	Y ₁₃₁	Y ₁₄₁	Y ₁₅₁	Y ₁₆₁	Y _{.1}	Y _{.1}
	R ₂	Y ₁₁₂	Y ₁₂₂	Y ₁₃₂	Y ₁₄₂	Y ₁₅₂	Y ₁₆₂	Y _{.2}	Y _{.2}
	R ₃	Y ₁₁₃	Y ₁₂₃	Y ₁₃₃	Y ₁₄₃	Y ₁₅₃	Y ₁₆₃	Y _{.3}	Y _{.3}
2	R ₁	Y ₂₁₁	Y ₂₂₁	Y ₂₃₁	Y ₂₄₁	Y ₂₅₁	Y ₂₆₁	Y _{.4}	Y _{.4}
	R ₂	Y ₂₁₂	Y ₂₂₂	Y ₂₃₂	Y ₂₄₂	Y ₂₅₂	Y ₂₆₂	Y _{.5}	Y _{.5}

	R ₃	Y ₂₁₃	Y ₂₂₃	Y ₂₃₃	Y ₂₄₃	Y ₂₅₃	Y ₂₆₃	Y _{.6}	Y _{.6}
3	R ₁	Y ₃₁₁	Y ₃₂₁	Y ₃₃₁	Y ₃₄₁	Y ₃₅₁	Y ₃₆₁	Y _{.7}	Y _{.7}
	R ₂	Y ₃₁₂	Y ₃₂₁	Y ₃₃₂	Y ₃₄₂	Y ₃₅₂	Y ₃₆₂	Y _{.8}	Y _{.8}
	R ₃	Y ₃₁₃	Y ₃₂₂	Y ₃₃₃	Y ₃₄₃	Y ₃₅₃	Y ₃₆₃	Y _{.9}	Y _{.9}
4	R ₁	Y ₄₁₁	Y ₄₂₁	Y ₄₃₁	Y ₄₄₁	Y ₄₅₁	Y ₄₆₁	Y _{.10}	Y _{.10}
	R ₂	Y ₄₁₂	Y ₄₂₂	Y ₄₃₂	Y ₄₄₂	Y ₄₅₂	Y ₄₆₂	Y _{.11}	Y _{.11}
	R ₃	Y ₄₁₃	Y ₄₂₃	Y ₄₃₃	Y ₄₄₃	Y ₄₅₃	Y ₄₆₃	Y _{.12}	Y _{.12}
5	R ₁	Y ₅₁₁	Y ₅₂₁	Y ₅₃₁	Y ₅₄₁	Y ₅₅₁	Y ₅₆₁	Y _{.13}	Y _{.13}
	R ₂	Y ₅₁₂	Y ₅₂₂	Y ₅₃₂	Y ₅₄₂	Y ₅₅₂	Y ₅₆₂	Y _{.14}	Y _{.14}
	R ₃	Y ₅₁₃	Y ₅₂₃	Y ₅₃₃	Y ₅₄₃	Y ₅₅₃	Y ₅₆₃	Y _{.15}	Y _{.15}
6	R ₁	Y ₆₁₁	Y ₆₂₁	Y ₆₃₁	Y ₆₄₁	Y ₆₅₁	Y ₆₆₁	Y _{.16}	Y _{.16}
	R ₂	Y ₆₁₂	Y ₆₂₂	Y ₆₃₂	Y ₆₄₂	Y ₆₅₂	Y ₆₆₂	Y _{.17}	Y _{.17}
	R ₃	Y ₆₁₃	Y ₆₂₃	Y ₆₃₃	Y ₆₄₃	Y ₆₅₃	Y ₆₆₃	Y _{.18}	Y _{.18}
Total de tratamientos		Y _{.1}	Y _{.2}	Y _{.3}	Y _{.4}	Y _{.5}	Y _{.6}	Y _{..}	Y _{..}
Medias		Y _{.1}	Y _{.2}	Y _{.3}	Y _{.4}	Y _{.5}	Y _{.6}		Y _{..}

2.3.1.7 Análisis de Datos

Se realizará un análisis descriptivo, inferencial sobre la población, además se utilizará una inferencia sobre la población a través de la prueba de hipótesis basada en pruebas de comparación múltiple en este caso se utilizará la prueba de Tuckey, el análisis estadístico se lo realizará utilizando como Software. Las fórmulas para el cálculo de ANOVA para calcular la variación entre tratamientos, bloques y error experimental.

La determinación de análisis de varianza queda como un D.B.C.A, se desea considerar únicamente los tratamientos, que se detallan en la tabla 16.

Tabla 16. ANOVA para un diseño de un factor.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Razón de Varianza
Tratamientos	$1/n \sum y_{.j}^2 - (y_{...})^2 / n * k$	k-1	SCTr/(k-1)	CMTr/CME
Bloques(Tiempo)	$1/k \sum y_{.i}^2 - (y_{...})^2 / n * k$	n-1	SCB/(n-1)	
Error	SCT(SCB+SC Tr)	k(n-1)	SCE/(k-1)(n-1)	
Total	$\sum y_{ij}^2 - (y_{...})^2 / n * k$	kn-1		

CAPÍTULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de vegetación contaminada por derrames de petróleo

Para los análisis biológicos y químicos de la vegetación contaminada se tomaron una muestra inicial.

La vegetación contaminada por derrames de petróleo fue caracterizado por LABPAM en Lago Agrio, acorde a los requerimientos y límites permisibles para Suelos de Uso agrícola de la Tabla 6 del RAOHE, con lo cual se obtendrá resultados sobre TPH y Metales Pesados.

Para lo análisis biológicos y químicos de vegetación contaminada se tomaran una muestra inicial y luego una muestra por unidad experimental, hasta alcanzar los límites permisibles en el RAOHE.

Tabla 6 del RAOHE, con lo cual se obtendrá resultados sobre Hidrocarburos Totales (TPH) y metales pesados (Cd, Ni, Pb).

Tabla 17. Caracterización de Vegetación contaminada con Petróleo

Parámetro	Expresado en	Unidad	Valor	Uso agrícola
Hidrocarburos totales	TPH	mg/Kg	86500	<2500
Cadmio	Cd	mg/Kg	0,8	<2

Níquel	Ni	mg/Kg	37,41	<50
Plomo	Pb	mg/Kg	20	<100
Potencial de Hidrógeno	pH	---	5	6-8
Humedad	---	%	27,78	---
Aerobios Mesófilos	---	UFC/g	$5 * 10^6$	---

De acuerdo con los valores observados en la primera caracterización se deduce que el valor de Hidrocarburos Totales (TPH) sobrepasa los límites permisibles según el RAOHE para suelos de uso agrícola, podemos ver también resultados de metales pesados de acuerdo al reglamento antes mencionado se encuentran vago los límites permisibles, pero durante todo nuestro trabajo no se descuido en seguir realizando los análisis de los mismos.

3.2. Parámetros de control durante la biorremediación

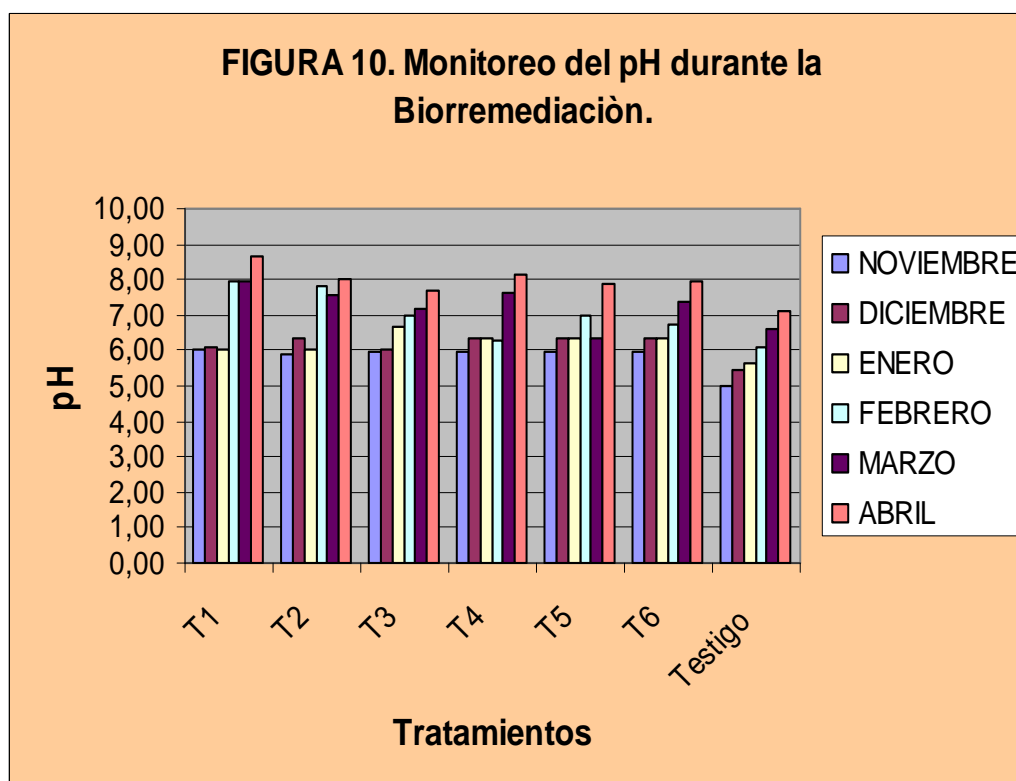
En las tablas 21, 22, 23, 24, 25 y 26 ANEXO (4) se muestran los valores medios de los parámetros de control de cada una de las unidades experimentales. De lo antes mencionado se obtuvo las siguientes figuras 10,11, 12,13 ,14 y 15.

3.2.1 Potencial de Hidrógeno

En la figura 10, nos da a conocer como ha ido evolucionando el valor de pH al inicio del tratamiento teníamos un valor de 5,00 (caracterización inicial) por lo que tenemos un valor de pH ácido durante los tres primeros meses (noviembre, diciembre y enero), permanecen en un rango de 5,93-6,00 ligeramente ácido, con el transcurso de los días podemos apreciar un incremento con respecto al pH que va desde 6,71 a 8,65 a partir del mes de febrero hasta el último mes de

experimentación abril para todos los tratamientos, pero con respecto al testigo se mantuvo en este rango desde el mes de febrero.

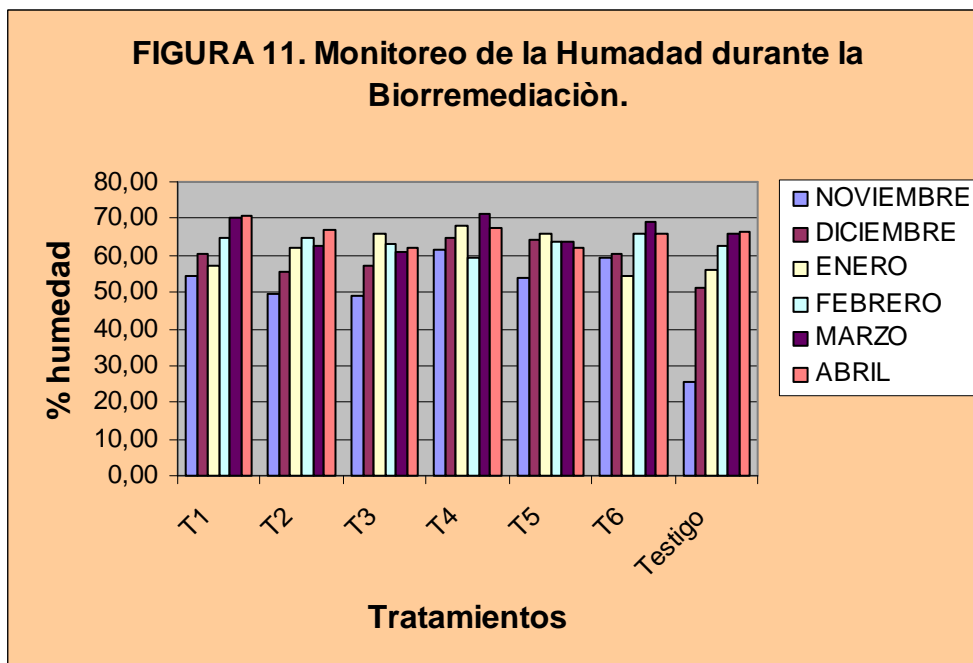
Cabe destacar que para el aumento de pH hubo la necesidad de incorporar carbonato de calcio (cal).



3.2.2. Humedad.

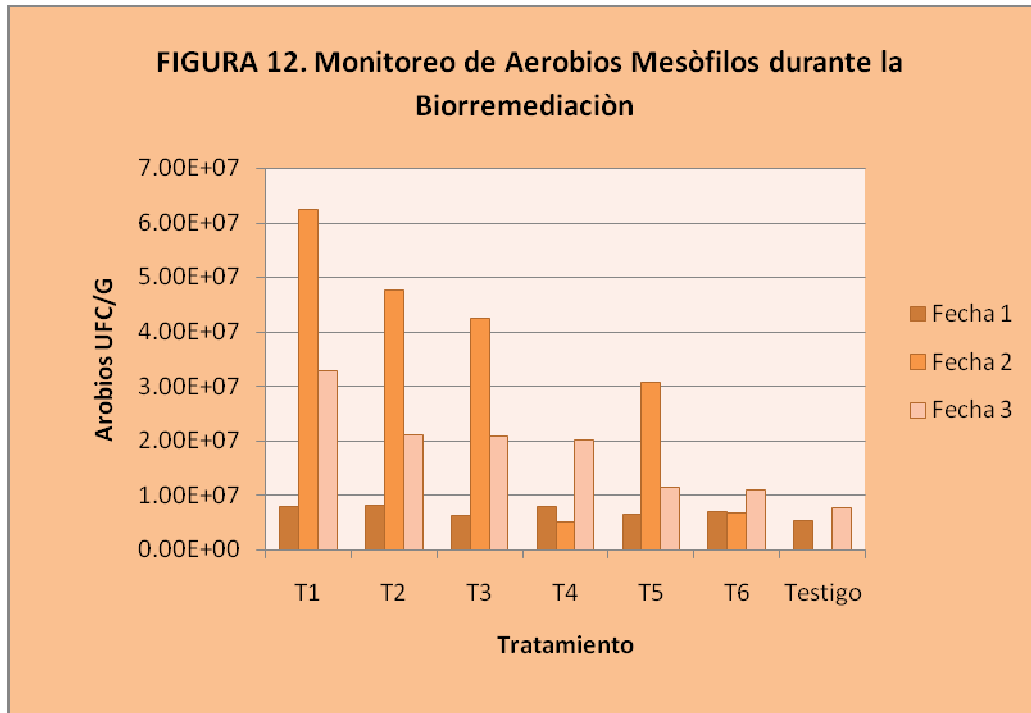
En la figura 11, nos da a conocer como ha ido evolucionando el valor de humedad al inicio del tratamiento teníamos 27,78% (caracterización inicial) por lo que tenemos un valor de humedad relativamente bajo, con el transcurso de los días obtuvimos un valor de humedad normal gracias a que constantemente añadíamos agua durante todo el proceso de biorremediación para la actividad metabólica de los microorganismos, de esta manera a partir del mes de diciembre nos mantenemos en un rango de 50 a 70% de humedad para todos

los tratamientos, un déficit de humedad impide el desarrollo de los microorganismos.



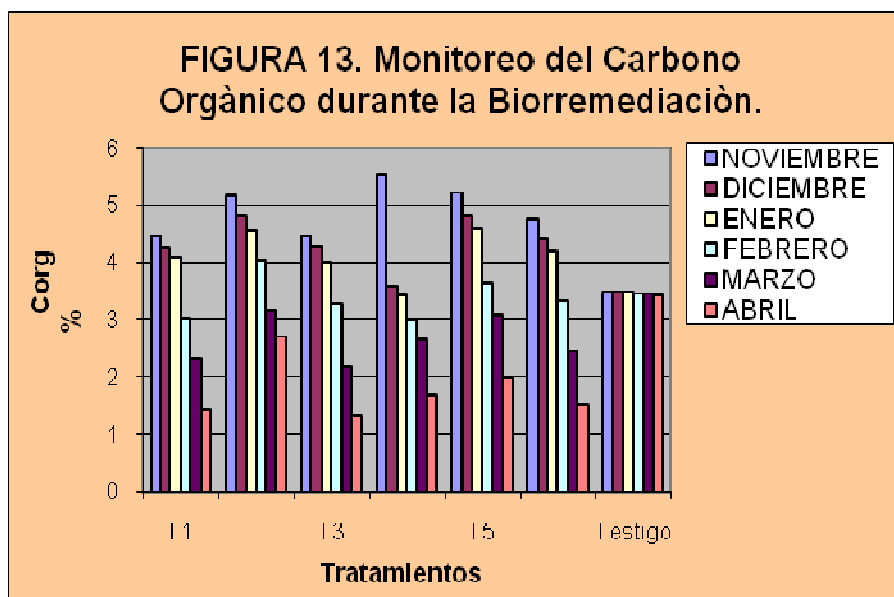
3.2.3. Aerobios Mesófilos

En la figura 12, nos da a conocer como ha ido evolucionando el crecimiento bacteriano al inicio del tratamiento teníamos $5,4 \cdot 10^6$ (caracterización inicial) con el transcurso de los días obtuvimos un valor de $3,3 \cdot 10^7$ gracias a que constantemente añadíamos cantidades considerables de nutrientes durante todo el proceso de biorremediación, es así que los tratamientos T₁, T₂, son los que mayor crecimiento microbiano presentan.



3.2.4. Control de Carbono Orgánico

En la figura 13 puede apreciar que los niveles de concentración del carbono están presentes en cantidades altas durante los tres primeros meses, disminuyendo así lentamente a partir del mes de febrero, llegando a obtener resultados medios, mientras que los últimos meses se observa resultados adecuados con respecto a la cantidad de carbono con respecto al tratamiento (T₁).



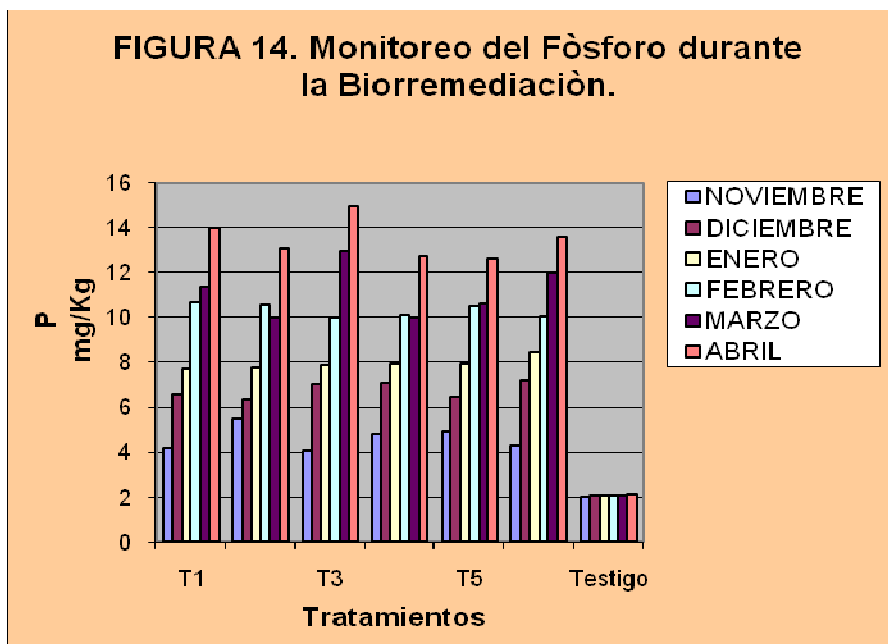
En la muestra testigo, de igual forma va disminuyendo lentamente los valores de la cantidad de carbono de manera lenta.

Para llegar a los niveles adecuados de concentraciones de carbono se debe controlar la Temperatura, Humedad, pH y finalmente el análisis químico

3.2.5 Control de Nutrientes Fósforo

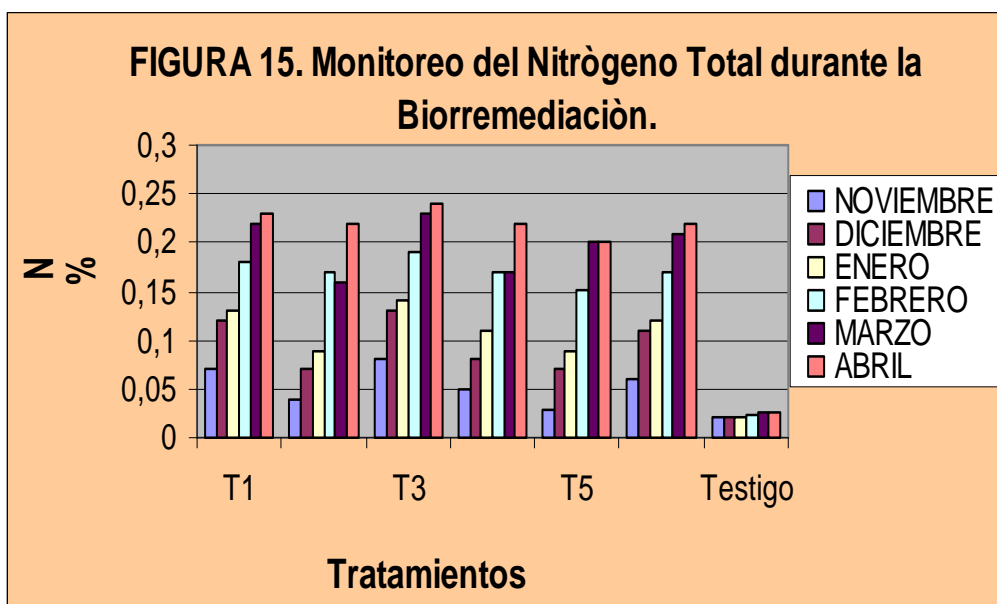
En la figura 14 se puede apreciar cómo va incrementando la cantidad de fósforo, iniciando con una concentración baja en los primeros meses (noviembre-diciembre), mientras que en los meses de (enero – febrero) presentan una concentración media, llegando casi a los niveles adecuados en los últimos meses (marzo- abril).

En la muestra (testigo) lentamente incrementa la concentración de fósforo durante los seis meses de experimentación



3.2.6. Control de Nitrógeno Total

En la figura 15 nos muestra la cantidad de nitrógeno durante los tres primeros meses (noviembre-diciembre), sus rangos presentan niveles de concentraciones bajos de nitrógeno, mientras que en los meses (febrero-abril) lentamente aumenta su concentraciones llegando a valores medios en los tratamientos (T₁,T₂),y los tratamientos(T₅,T₆) presentan valores casi adecuados de concentración con respecto al fósforo.



En la muestra (Testigo), cada análisis durante los seis meses de experimentación, nos indica que el aumento de nitrógeno es muy lento.

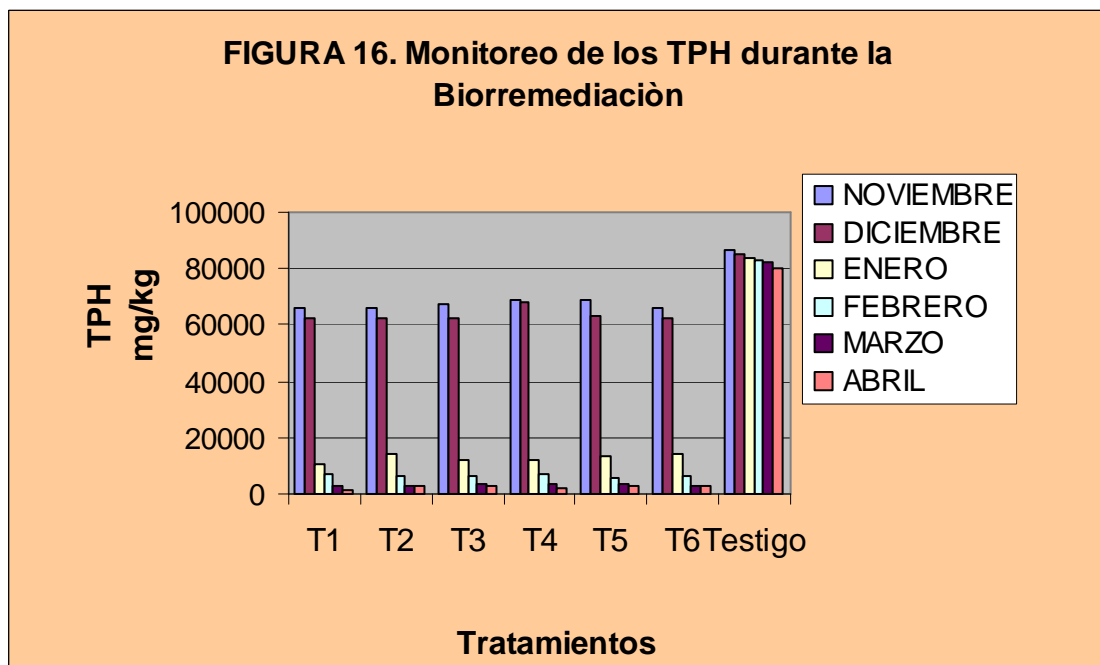
3.3. Parámetros de medición durante la biorremediación

En las tablas 27, 28, 29 y 30 ANEXO (5) se muestran los valores medios de los parámetros de medición de cada una de las unidades experimentales. De lo antes mencionado se obtuvo las siguientes figuras 20, 21, 22 y 23.

3.3.1. Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH)

En la figura 16, nos da a conocer como ha ido evolucionando los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) durante todo el proceso de biorremediación se incluye también testigo, se puede apreciar que en el tercer mes (enero) surgió una disminución considerable de TPH debido a la adición de acondicionadores, caso contrario con testigo su valor permanece constante.

Cabe mencionar que los T₁ y T₂, son los que han tenido buenos resultados en la disminución de hidrocarburos totales de petróleo.



El tratamiento involucra lavar el material contaminado con agua a alta presión, se ve una disminución del contaminante (TPH) a partir mes de enero.

Tabla 18. Análisis tabla de ANOVA con STATGRAPHICS TPH

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Significación
Tratamientos	2.89517E10	5	5.79035E9	3603.71	0.0000
Bloques	2.33375E7	5	4.6675E6	2.90	0.0335
Error	4.01694E7	25	1.60677E6		
Total	2.90152E10	35			

Si las medias de los tratamientos son diferentes entre sí se pueden considerar los tests de comparaciones múltiples y de rangos estudentizados, que se vieron para el modelo unifactorial general. Se ha de reemplazar el número de réplicas por nivel del factor (n) por el número de bloques (b).

En este estudio de investigación con la parte relacionada con el análisis de varianza, siendo esta la forma más sencilla de su uso.

A través del factor Fisher de 2.90 el cual al compararlo con los valores preestablecidos en las tablas para una investigación con 25 GL., nos indica existe diferencia significativa al 5%.

Rechazamos nuestra hipótesis nula H_0

Aceptamos nuestra hipótesis alternativa H_1 para lo cual existen pruebas de comparación múltiple en este caso lo analizaremos mediante la prueba de Tukey.

Tabla 19. Prueba de TUKEY para los TPH

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Forml.	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
6	6	2480.33	X
5	6	3401.5	X
4	6	6528.17	X
3	6	12794.2	X
2	6	64268.2	X
1	6	67757.3	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*3489.17	2255.84
1 - 3	*54963.2	2255.84
1 - 4	*61229.2	2255.84
1 - 5	*64355.8	2255.84

1 - 6	*65277.0	2255.84
2 - 3	*51474.0	2255.84
2 - 4	*57740.0	2255.84
2 - 5	*60866.7	2255.84
2 - 6	*61787.8	2255.84
3 - 4	*6266.0	2255.84
3 - 5	*9392.67	2255.84
3 - 6	*10313.8	2255.84
4 - 5	*3126.67	2255.84
4 - 6	*4047.83	2255.84
5 - 6	921.167	2255.84

* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

Esta tabla se aplica un procedimiento de comparación múltiple lo cual nos da a conocer cual es el mejor tratamiento.

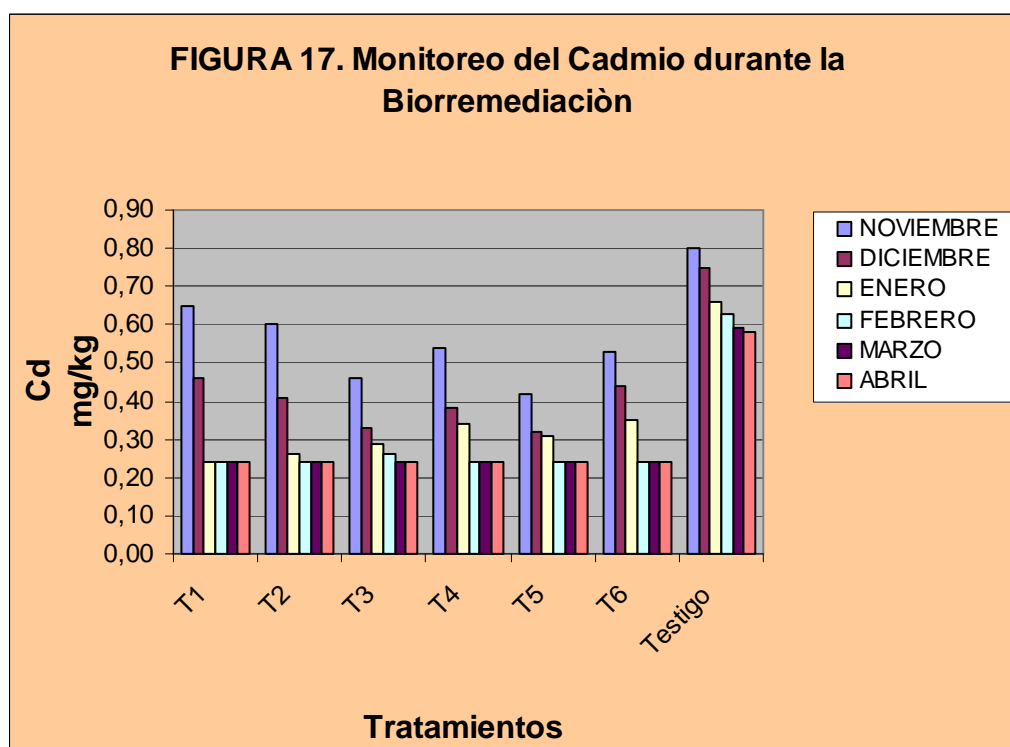
Un asterisco se ha colocado junto a 14 pares, lo que indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas en el 95,0% nivel de confianza.

3.3.2. Metales pesados (Cadmio)

En la figura 17, nos da a conocer como ha ido evolucionando metales pesados en cada uno de los tratamientos en este caso tenemos Cadmio que ha disminuido considerablemente durante todo el proceso de biorremediación se incluye también testigo, se puede apreciar que en el mes esto fue en enero

surgió una disminución considerable de cadmio, caso contrario con testigo su valor permanece constante.

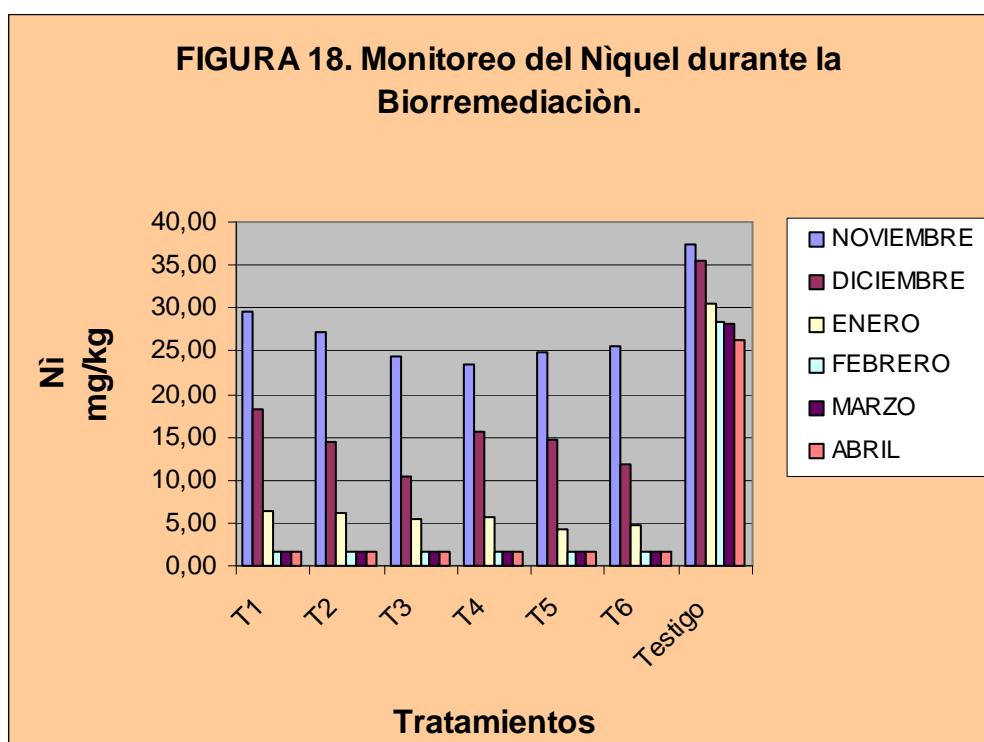
Cabe mencionar que los T₁, y T₂, son los que han tenido buenos resultados en la disminución de de este contaminante como es Cadmio.



3.3.3. Níquel

En la figura 18, nos da a conocer como ha ido evolucionando metales pesados en cada uno de los tratamientos en este caso tenemos Níquel que ha disminuido considerablemente durante todo el proceso de biorremediación se incluye también testigo, se puede apreciar que en el mes de febrero surgió una disminución considerable de níquel, caso contrario con testigo su valor permanece constante.

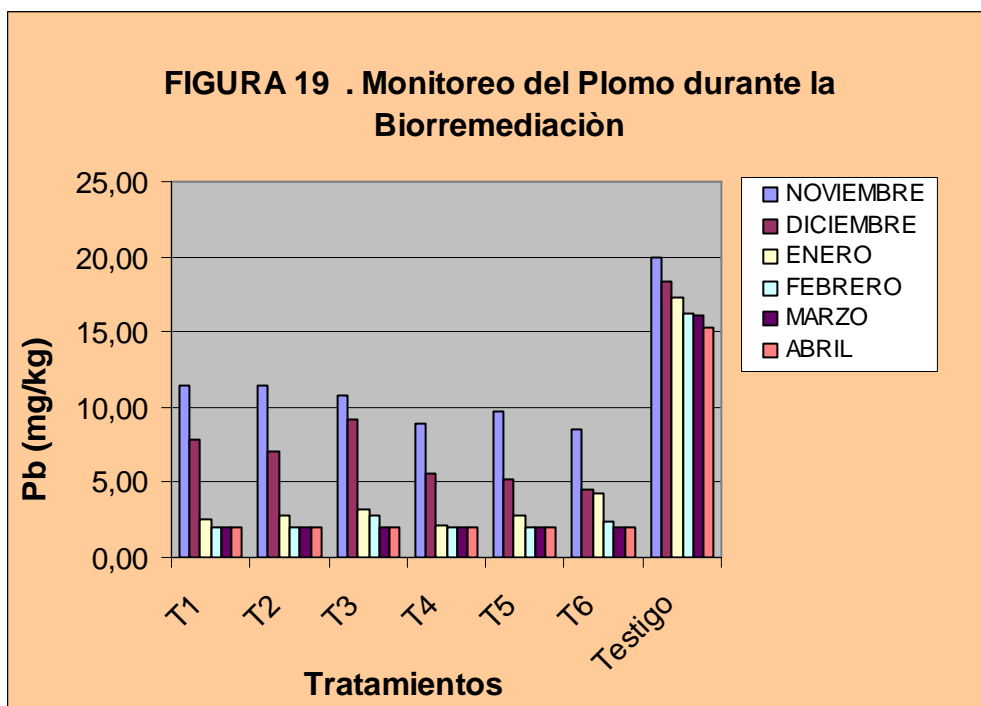
Cabe mencionar que los T₁, y T₂, son los que han tenido buenos resultados en la disminución de de este contaminante como es Níquel.



3.3.4. Plomo

En la figura 19, nos da a conocer como ha ido evolucionando metales pesados en cada uno de los tratamientos en este caso tenemos Plomo que ha disminuido considerablemente durante todo el proceso de biorremediación se incluye también testigo, se puede apreciar en el mes de diciembre surgió una disminución considerable de níquel, caso contrario con testigo su valor permanece constante.

Cabe mencionar que los T₁ y T₂, son los que han tenido buenos resultados en la disminución de de este contaminante como es Plomo.

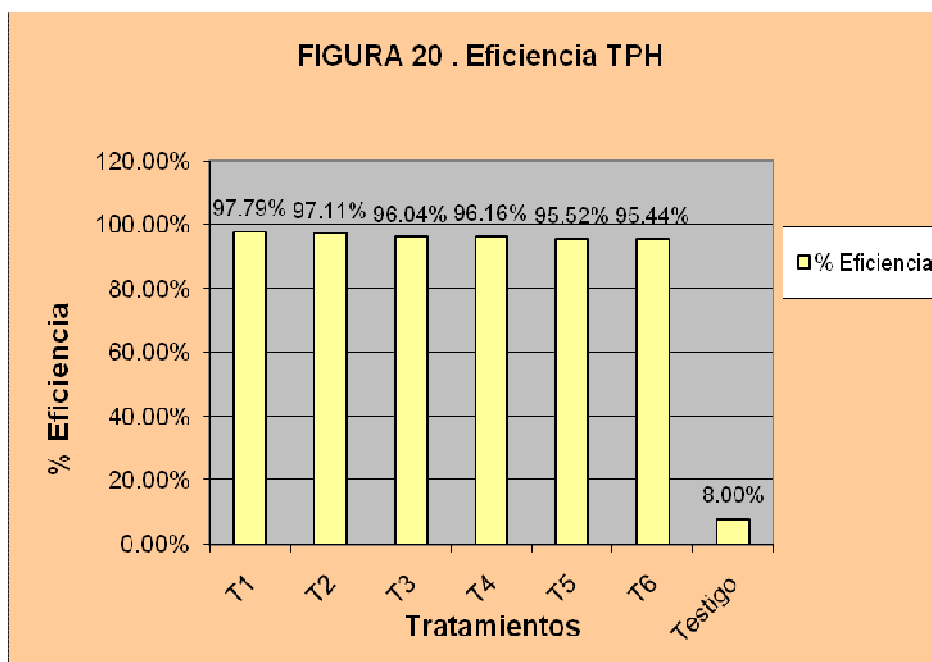


3.4. Eficiencia de los parámetros de medición de los tratamientos durante la biorremediación

De acuerdo a todos los datos obtenidos se puede determinar en que porcentaje se ha ido degradando los contaminantes durante los seis meses que se llevó a cabo la biorremediación; Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH), Metales Pesados (Cd, Ni, Pb), se da a conocer en las siguientes figuras 20, 21, 22 y 23.

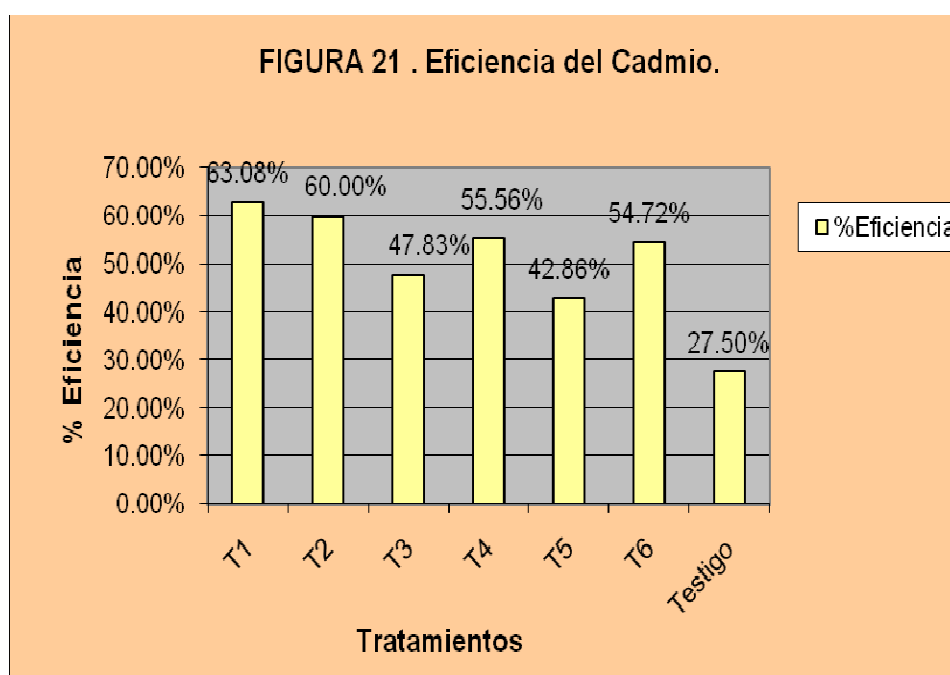
3.4.1. Eficiencia de Hidrocarburos de Petróleo (TPH)

Cabe mencionar que en la figura 20 se puede apreciar que los tratamientos T₁ (97,79%) y el T₂ (97,11%), son los que mayor porcentaje de degradación tienen en la descomposición de hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH).



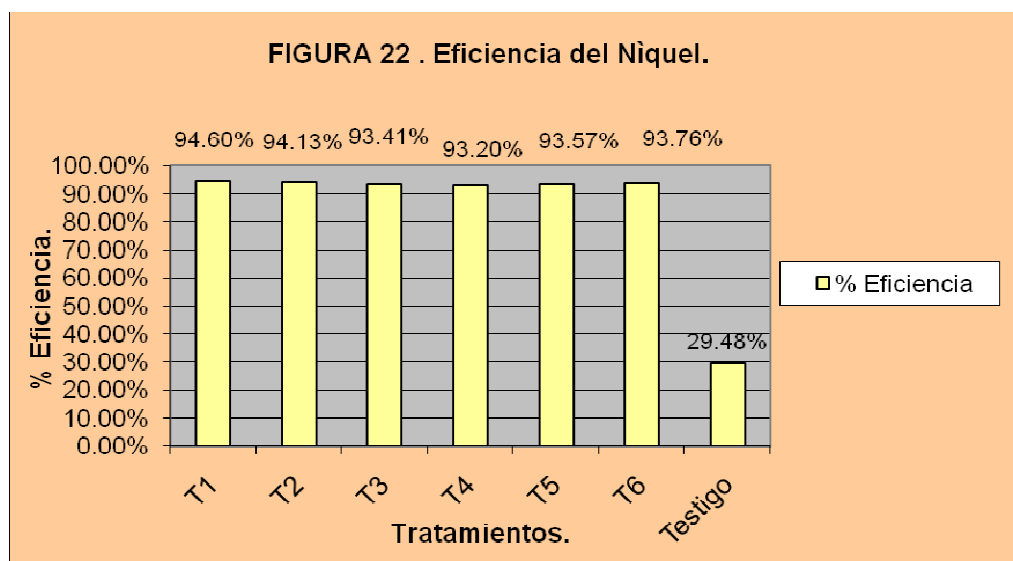
3.4.2. Eficiencia de Metales Pesados (Cd)

Cabe mencionar que en la figura 21 se puede apreciar que los tratamientos T₁ (63,08%) y T₂ (60,00%), los valores del cadmio siempre estaban bajo la norma según la RAOHE (< 2 mg/kg) para uso agrícola RAOHE.



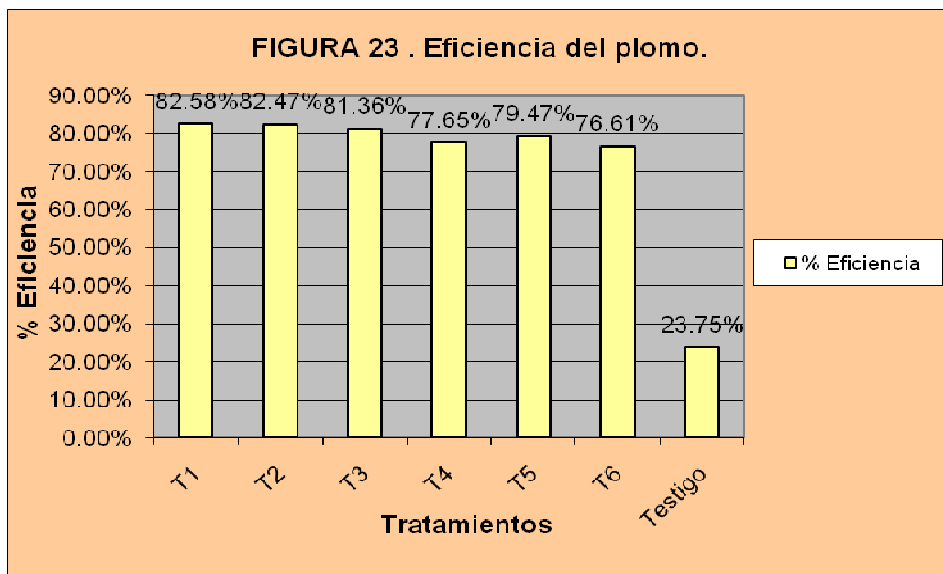
3.4.3. Eficiencia de Metales Pesados (Ni)

Cabe mencionar que en la figura 22 se puede apreciar que los tratamientos T₁ (94,60%) y T₂ (94,13%) los valores del níquel siempre estaban bajo la norma según la RAOHE (< 50 mg/kg) para uso agrícola RAOHE.



3.4.4. Eficiencia de Metales Pesados (Pb)

Cabe mencionar que en la figura 23 se puede apreciar que los tratamientos T₁ (82,58%), T₂ (82,47%) y T₃ (81,36%) los valores del plomo siempre estaban bajo la norma según la RAOHE (< 100 mg/kg) para uso agrícola.



Con el porcentaje de eficiencia de los seis tratamientos en estudio mediante la atenuación natural, bioestimulación, se llevó a cabo satisfactoriamente el proceso de degradación de los contaminantes (TPH, Cd, Ni, Pb) durante la Biorremediación, obteniéndose valores que fluctúan (60 -97%). Con todo lo expuesto se acepta la hipótesis planteada.

CAPÍTULO IV

4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones:

1. Los microorganismos en el proceso de degradación de hidrocarburos desempeñan un papel importante, al inicio del tratamiento podemos ver un valor de $(5,4 \times 10^6 \text{ UFC/g})$ como muestra inicial, con el transcurso del tiempo

hubo incremento en la actividad microbiana durante los seis meses de estudio en el tratamiento T₁ obteniendo un valor de $(6,4 \times 10^7 \text{ UFC/g})$, por lo tanto mientras mayor cantidad de microorganismos exista la degradación de los hidrocarburos es mayor.

2. Queda demostrado que en la vegetación contaminada no llega en seis meses a biorremediarse por la población microbiana natural sin la adición de nutrientes y acondicionadores existentes, aireación y humectación periódica del área tratada.

3. Al realizar el análisis estadístico en el proceso de degradación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH), metales pesados (Ni, Cd, Pb) y microorganismos se obtuvieron los siguientes valores durante el último mes (Abril) de experimentación en el tratamiento T₁: TPH(1465 mg/Kg), metales Cd (0.24 mg/kg, Pb (2.00 mg/kg), Ni (1.600 mg/kg).

Y Aerobios Mesòfilos $(6,4 \times 10^7 \text{ UFC/g})$.

4. Se ha demostrado que la técnica de compostaje es eficiente y económico para seguirla aplicando en el proceso de Biorremediación de vegetación contaminada con petróleo.

5. El tratamiento de Biorremediación aplicando la técnica de Compostaje por bioestimulación al área impactada resultó efectivo, observándose una disminución en la concentración de hidrocarburos, obteniendo un porcentaje de

eficiencia de degradación en el tratamiento T₁: TPH (97.79%) y el T₂ TPH (97.11%) y en los metales pesados en el T₁ Cd (63,08%) y T₂ (60,00%), T₁ Ni (94,60%), y T₂ (94,13%), T₁ Pb (82,58%), T₂ (82,47%) ,llegando a los límites permisibles estipulados en el Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas según la (RAOHE) y seguros que este sea utilizado como abono para las plantas ornamentales

6. En definitiva el experimento alcanzo sus objetivos a través del proceso de compostaje por bioestimulación y monitoreo de los parámetros de control y medición, se determinó que el T₁ es el mejor obteniendo de esa manera un valor de TPH (1465 mg/Kg) es el más idóneo para llevar a cabo la Biorremediación de la vegetación contaminada.

4.2. Recomendaciones

1. El proceso de compostaje en Biorremediación de vegetación contaminada con petróleo es factible por ser una técnica económica y da buenos resultados.

2. Implementación de equipos en el Laboratorio de Unidad de Protección Ambiental (UPA) de Lago Agrio (PETROECUADOR) de esta manera se facilitara el proceso de investigación.

3. Dadas las bondades que presenta este tipo de técnica, es recomendable que la empresa mediante estos tipos de investigación conozcan los beneficios que involucra la técnica antes mencionada para la empresa, comunidades y el ambiente que son directamente afectados por las emisiones líquidas de la industria petrolera.

RESUMEN

La investigación tiene por objeto biorremediar vegetación contaminada con petróleo por derrames en el campamento Guarumo – Petroproducción, con el fin de disminuir la concentración de hidrocarburos totales de petróleo hasta llegar a límites permisibles estipulados (RAOHE), se realizó aplicando una técnica de compost mediante bioestimulación.

Para alcanzar el objetivo planteado se realizó 6 tratamientos ($T_1 - T_6$) con 3 réplicas cada una mas la cantidad de desechos orgánicos vegetales no contaminados (75,55,45,25,35 y 65%) y el acondicionador aserrín (25,45,55,75,65 y 35%), para incrementar la actividad microbiana, la vegetación contaminada fue distribuida en partes iguales (100%) en 6 bioceldas mientras que se utiliza como testigo (T_7), controlado por atenuación natural, siguiendo un control de los tratamientos mediante análisis físico-químicos y microbiológicos cada 30 días en el período, Noviembre 2007- Abril 2008.

Se obtuvo una reducción de hidrocarburos de petróleo en el T_1 (75% MO, 25% A) obteniendo un porcentaje de eficiencia de TPH en un 97,79%, Cd 63,08%, Ni 94,60% y Pb 82,58%, en comparación con el T_7 testigo que obtuvo un porcentaje de TPH 8,00%; se observó presencia de metales pesados de todos los tratamientos, hallándose en niveles inferiores a los límites permisibles según la RAOHE. El proceso de Biorremediación por Compost mediante bioestimulación inicia con un valor de aerobios mesófilos de $5,4 * 10^6$ en la vegetación contaminada; en comparación con la muestra inicial aumentó la actividad microbiana llegando a un valor de $3,30 * 10^7$ lo cual demuestra que es un buen método de Biorremediación de hidrocarburos totales de petróleo TPH, opción económica y factible para Biorremediar.

SUMARARY

This investigation deals with bio-remedying the vegetation polluted with oil spills in the camp Guarumo-Petroproducción, to diminish the total oil hydrocarbon concentration up to reaching the permissible limits (RAOHE), it was carried out applying a compost technique through biostimulation.

To attain the proposed objective six treatments ($T_1 - T_6$) with 3 replications each were carried out plus the non-polluted organic vegetable waste quantity (75,55,45,25,35 and 65%) and the sawdust conditioner (25,45,55,75,65 and 35%), were carried out to increase the microbial activity. The polluted vegetation was distributed in equal parts (100%) into six biocells while using the control treatment (T_7), controlled bay natural attenuation, following a treatment control through the physical and chemical and microbiological analysis each thirty days in the period November 2007-April 2008.

A reduction of the oil hydrocarbons was obtained in the T_1 (75% MO, 25%A) with an efficiency percentage of TPH in a 97,79%,63,08% Cd, 94.60% Ni and Pb 82,58%, as compared to the control to the control (T_7) wich obtained a percentage of TPH 8,00%; the presence of heavy metals of all the treatments was observed, being at the levels lower than the permissible ones according to RAOHE. The bio-remedying process bay compost through boistimulation starts with a value of mesophyll aerobes of $5,4 \cdot 10^6$ in the polluted vegetation; as compared to the initial sample the microbial activity increased reaching a value of $3,30 \cdot 10^7$ wich shows that it is a good bio-remedyng method of total oil hydrocarbons TPH, an economic and feasible option for bio-remedyng.

BIBLIOGRAFIA

1. **CORONA-RAMÍREZ L, ITURBE-ARGÜELLES R.** Atenuación Natural en Suelos Contaminados con Hidrocarburos. 2da. ed. Madrid: Parson Educación, 2005. pp. 119-126.
2. **DANIEL, D.** Geotechnical Practice for Waste Disposal. 2da. ed. Cincinnati: Prentice Hall, 1993. pp. 235-240.
3. **EUROCONSULT.** Agricultural Compendium. 2da. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. pp. 8,10,15,18.
4. **EWEIS, J et all.** Principios de Biorrecuperación. 3ea. ed. Malaysia: Mac Graw Hill, 1999. pp. 245-255.
5. **FAO:** Fertilizar and Plant Nutrition. Rome, 1984.
6. **GESTIÓN AMBIENTAL HIDROCARBURÍFERA.** Reglamento Ambiental para la Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador. Quito: Horizont 3000, 2001. pp. 112.
7. **LAGREGA, M.** Gestión de Residuos Tóxicos. Tratamiento, Eliminación y Recuperación de Suelos. 2da. ed. Malaysia: Mc Graw Hill, 1996, pp. 89-102
8. **LEVIN, L.; GEALT M.** Biotratamiento de Residuos Tóxicos y Peligrosos. Selección, Estimación, Modificación de Microorganismos y Aplicación. 3ra. ed. New York: Plenum Press, 1991. pp. 225-261.

9. **LOSSER, C.** Microbial Degradation of Hydrocarbons in Soil During aerobic/anaerobic Changes and under Purely Aerobic conditions. 2da. ed. Toronto: Biotech, 2001. pp.631 – 636.

10. **MAROTO, A.** Sistemas de Biorremediación de Suelos y Aguas Contaminadas por Hidrocarburos. 3era. ed. Madrid: Geocisa, 2001. pp. 896.

11. **MONTOYA, D.** La Biotecnología. Presente y Futuro en Colombia y América Latina. 2da. ed. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 1990. pp. 578.

12. **PAZMIÑO, J.** Biorremediación de Suelos Contaminados con Petróleo. 4ta. ed. Caracas: Días de Santos, 2002. pp.156.

13. **RISER-ROBERS, E.** Remediation of Petroleum Contaminated Soils. Biological Physical, and Chemical Processes. 2da. ed. Malaysia: McGraw Hill, 1996. pp. 148.

14. **SMITH, J., and PAUL, E.** The Significance of Soil Microbial Biomasa Estimations in. Soil Biochem. New York: Penm Well, 1990. V.6. pp. 148.

REFERENCIAS EN INTERNET

15. Aplicaciones de la Biorremediación (caso del desastre del Prestige en la costa de Galicia)

http://www.belt.es/noticias/2003/febrero/24_28/28/prestige.htm.

Fecha de consulta: 09 – 03 – 2008.

16. Bacterias que degradan petróleo

<http://www.oei.org.co/sii/entrega20/art08.htm> - 11k -

Fecha de consulta: 22 – 01 – 2008.

17. Biorremediación

<http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Biorremed.htm> - 8k -

Fecha de consulta: 06 - 11 – 20007.

18. Biorremediación de *suelos contaminados con petróleo*.

<http://www.monografias.com/trabajos38/biotecnologia-petroleo/biotecnologia-petroleo.Shtml> -

Fecha de consulta: 15 - 12 – 2007.

19. Biorremediación en Mendoza (Universidad de Cuyo)

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

Fecha de consulta: 22 – 03 – 2008.

20. Capacidad de biodegradación Hidrocarburos

<http://www.biorremediacion.org/contenido/biorremediacion/index.html>-
12 k

Fecha de consulta: 11 – 01 – 20008.

21. Compostaje

<http://www.infoagro.com/abonos/compostaje.asp> - 28k -

Fecha de consulta: 25 – 05 – 2008.

22. Documento de INTI (Instituto Nacional de Tecnología Industrial y UBA)

<http://www.inti.gov.ar/cequipe/dicaria.pdf>

Fecha de consulta: 17 – 05 – 2008.

23. Metales Pesados, Ambiente y Salud.

<http://www.ecoportal.net/content/view/full/37424> - 94k -

Fecha de consulta: 22 – 05 – 2008.

24. Microbiología y metales pesados. Revista Química viva. Vol. 2, número 3, 2003.

<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar>

Fecha de consulta: 15 – 05 - 20008

ANEXO 1

DIAGNÒSTICO AMBIENTAL DE LA REGIÓN.

MES	PRECIPITACIÓN (mm)	TEMPERATURA (°C)	HUMEDAD (%)
ENERO	143,2	28,3	70
FEBRERO	141,1	27,5	75
MARZO	178,8	27,0	79
ABRIL	244,5	26,5	82
MAYO	217,6	26,6	81
JUNIO	238,8	25,4	84
JULIO	282,8	24,5	86
AGOSTO	176,4	25,7	80
SEPTIEMBRE	191,5	26,6	79
OCTUBRE	223,7	27,2	77
NOVIEMBRE	249,6	26,8	80
DICIEMBRE	104,3	28,0	74

Fuente: Anuario Metereológico e Hidrológico.

ANEXO 2

RH-300 PRODUCTO BIODEGRADABLE PARA TRATAMIENTO DE RESIDUOS ACEITOSO, UELO Y LODOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS Y DERIVADOS.

El producto RH 300 es una solución innovadora para los problemas específicos de contaminación por Hidrocarburos y un elemento importante en los procesos de limpieza industrial, recuperación de suelos contaminados.

Formulado a partir de productos Cítricos Orgánicos no derivados del Petróleo, el RH 300 neutraliza una gran variedad de contaminantes y logra estabilizar (Quelar) metales pesados.

Dentro de las más importantes características del RH 300 se destaca su no Toxicidad, no es inflamable, no contiene productos separados o destilados del petróleo y es completamente seguro de usar cerca de las Personas, animales, productos alimenticios y plantas.

El RH 300 tiene la habilidad de convertir hidrocarburos y otros contaminantes en una solución acuosa lo suficientemente segura como para ser vertida al sistema de alcantarillado municipal tanto como la regulación local o municipal lo permita. Esta solución también puede ser digerida por microorganismos presentes en agua y suelo.

Principios Químicos del RH 300.

Origen

El Rh 300 es un producto constituido por Solvente Orgánicos derivado de material Cítricos no obtenidos a partir de Derivados del Petróleo. Sus

componentes Básicos son los **d- Limonatos y Terpenos** obtenidos a partir de fritos cítricos.

Características Físico- químicas del Producto.

Punto de ebullición:	121 °C
Temperatura de encendido:	No inflamable
Densidad de vapor:	Aire = 1
Presión de vapor	Igual al agua = 1
pH:	10
Límite mínimo de explosión	N/A
Límite máximo de explosión	N/A
Punto de flama:	No encenderá
Soluble en agua:	Miscible en todas las proporciones
Rata de evaporación:	Agua = 1, menor que 1
Porcentaje de volátiles:	< 3%
Color y apariencia:	Líquido lechoso claro/transparente

Mecanismo de Reacción.

Los materiales contaminados con hidrocarburos y derivados de petróleo son convertidos en compuestos no tóxicos mediante procesos de hidrólisis y saponificación, adquiriendo la condición de un sustrato de solución de agua de aspecto jabonoso. El RH 300 rompe las cadenas de hidrocarburos facilitando su esterificación. En estas condiciones es fácilmente asimilable y metabolizado por los microorganismos mesófilos presentes en el suelo y agua.

Proceso de Quelación de Metales Pesados.

El RH 300 tiene la especial habilidad o característica de reducir o inactivar los metales pesados y los residuos mediante un proceso recaptura para lograr inactivarlos. Cuando un metal es capturado, los iones son retenidos por cadenas coordinadas y no serán liberados de nuevo durante el proceso.

Algunos de los metales pesados que el RH 300 puede quelar son: Arsénico, Cadmio, Cromo, Bario, Plomo, Zinc, Selenio, Níquel.

ANEXO 3

HOJA DE SEGURIDAD DEL MATERIAL: RH-300

1) IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO

- Nombre del producto: RH 300

2) INGREDIENTES PELIGROSOS

- Ingredientes peligrosos: Ninguno

3) CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS

Punto de ebullición:	121 0C
Temperatura de encendido:	No inflamable
Densidad de vapor:	Aire = 1

Presión de vapor	Igual al agua = 1
pH:	10
Límite mínimo de explosión:	N/D
Límite máxima de explosión:	N/D
Punto de flama:	No encenderá
Soluble en agua:	Miscible en todas las proporciones
Rata de evaporación:	Agua = 1, menor que 1
Porcentaje de volátiles:	< 3%
Color y apariencia:	Líquido lechoso claro/transparente

4) PELIGROS FÍSICOS

- Ninguno

5) PELIGROS PARA LA SALUD

Signos y Síntomas: Posible causa de irritación en la piel y ojos

6) EQUIPO ESPECIAL DE PROTECCIÓN

- Guantes de caucho normales, no requiere otros, al menos si la piel es sensible.

7) PRECAUCIONES ESPECIALES Y PROCEDIMIENTOS ENDERRAMES O FUGAS

- Diluir con agua, disponer y acordar con las autoridades locales las regulaciones

8) INFORMACIÓN ADICIONAL

- Las propiedades orales y dermatológicas no se consideran tóxicas, ni ambientalmente perjudiciales.
- Los productos no contienen mayores peligros.

ANEXO 4

VALORES MEDIOS DE LOS PARÀMETROS DE CONTROL

TABLA 21. pH

TRATAMIENTOS	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
T1	5,93	6,33	6,33	6,27	7,66	8,11
T2	5,99	6,00	6,66	7,00	7,21	7,69
T3	5,92	6,33	6,00	7,82	7,57	8,02
T4	5,99	6,33	6,33	7,00	6,33	7,86
T5	5,94	6,33	6,33	6,71	7,39	7,96
T6	6,00	6,10	6,00	7,97	7,95	8,65
Testigo	5,00	5,45	5,65	6,10	6,58	7,12

TABLA 22. HUMEDAD

TRATAMIENTOS	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
T1	49,67	55,39	61,81	64,96	62,55	66,74
T2	48,97	57,32	65,70	63,39	61,03	61,79
T3	61,28	64,97	68,02	59,54	71,32	67,43
T4	59,37	60,15	54,52	65,89	69,04	65,67
T5	53,71	64,29	65,80	63,78	63,43	61,96
T6	54,34	60,22	57,37	64,74	70,02	70,64
Testigo	25,78	51,36	55,85	62,65	65,89	69,42

TABLA 23. AEROBIOS MESÓFILOS

TRATAMIENTOS	Análisis Microbiológico (UFC/g)		
	Fecha 1	Fecha 2	Fecha 3
T1	8,05E+06	6,33E+07	3,30E+07
T2	6,44E+06	6,76E+06	3,25E+07
T3	7,13E+06	6,45E+07	3,15E+07
T4	6,56E+06	4,04E+07	2,22E+07
T5	6,66E+06	6,67E+06	2,15E+07
T6	7,15E+06	6,08E+07	2,10E+07
Testigo	5,40E+06	6,70E+06	7,85E+06

TABLA 24. Carbono orgánico

TRATAMIENTOS	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
T1	5,18	4,83	4,56	4,05	3,17	2,71
T2	5,23	4,83	4,6	3,65	3,10	2,00
T3	4,48	4,26	4,10	3,03	2,33	1,43
T4	5,55	3,58	3,43	3,01	2,65	1,67

T5	4,47	4,29	4,02	3,29	2,18	1,34
T6	4,76	4,43	4,19	3,35	2,45	1,52
Testigo	3,50	3,49	3,48	3,47	3,46	3,45

TABLA 25. Fósforo

TRATAMIENTOS	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
T1	4,17	6,58	7,72	10,68	11,35	13,98
T2	5,50	6,34	7,79	10,55	10	13,08
T3	4,03	7,01	7,89	9,99	12,99	14,99
T4	4,80	7,10	7,92	10,09	10,02	12,72
T5	4,93	6,43	7,95	10,5	10,6	12,62
T6	4,27	7,22	8,44	10,05	12	13,61
Testigo	2,00	2,03	2,04	2,06	2,07	2,09

TABLA 26. Nitrógeno

TRATAMIENTOS	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
T1	0,08	0,13	0,14	0,19	0,23	0,24
T2	0,04	0,07	0,09	0,17	0,16	0,22
T3	0,05	0,08	0,11	0,17	0,17	0,22
T4	0,07	0,12	0,13	0,18	0,22	0,23
T5	0,03	0,07	0,09	0,15	0,20	0,20
T6	0,06	0,11	0,12	0,17	0,21	0,22
Testigo	0,02	0,021	0,022	0,024	0,026	0,027

ANEXO 5

VALORES MEDIOS DE LOS PARÁMETROS DE MEDICIÓN

TABLA 27. TPH

TRATAMIENTOS	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	ENERO*	FEBRERO	MARZO	ABRIL
T1	66206	62112	10777	7350	2657	1465
T2	68686	67960	12217	7384	3272	1983
T3	65624	62386	14046	6277	2659	2600
T4	70018	67265	14097	6238	4441	2689

T5	68462	63193	13324	5356	3501	3064
T6	67548	62693	12304	6564	3879	3081
Testigo	86750	85012	84015	83156	82154	79812
Blanco	235	220	215	208	189	185

***El tratamiento involucra lavar el material contaminado con agua a alta presión, se ve una disminución del contaminante (TPH) a partir mes de enero.**

TABLA 28.CADMIO

TRATAMIENTOS	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
T1	0.65	0.46	0.24	0.24	0.24	0.24
T2	0.60	0.41	0.26	0.24	0.24	0.24
T3	0.46	0.33	0.29	0.26	0.24	0.24
T4	0.54	0.38	0.34	0.24	0.24	0.24
T5	0.42	0.32	0.31	0.24	0.24	0.24
T6	0.53	0.44	0.35	0.24	0.24	0.24
Muestra inicial	0.8	0.75	0.66	0.63	0.59	0.58
Blanco	0.031	0.028	0.026	0.24	0.24	0.24

TABLA 29. NÍQUEL

TRATAMIENTOS	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
T1	29.65	18.26	6.50	1.60	1.60	1.60
T2	27.28	14.32	6.05	1.60	1.60	1.60
T3	24.29	10.37	5.33	1.60	1.60	1.60
T4	23.53	15.61	5.66	1.60	1.60	1.60
T5	24.89	14.68	4.28	1.60	1.60	1.60
T6	25.66	11.92	4.64	1.60	1.60	1.60
Muestra inicial	37.41	35.45	30.5	28.31	28.2	26.38
Blanco	21,00	18,12	16,19	15,11	7,13	3,75

TABLA 30. PLOMO

TRATAMIENTOS	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
T1	11.48	7.89	2.48	2.00	2.00	2.00
T2	11.41	7.02	2.84	2.00	2.00	2.00

T3	10.73	9.23	3.22	2.75	2.00	2.00
T4	8.95	5.55	2.19	2.00	2.00	2.00
T5	9.74	5.22	2.85	2.00	2.00	2.00
T6	8.55	4.46	4.23	2.44	2.00	2.00
Muestra inicial	20	18.32	17.32	16.25	16.11	15.25
Blanco	7,89	7,08	5,78	5,67	4,73	2,56

ANEXO 6

Fotografía N^o1. Instalación del centro de acopio para Biorremediación por Compost.



Fotografía N^o 2. Codificación de Identificación de los diferentes tratamientos.



Fotografía N° 3. Traslado del material contaminado (vegetación con petróleo).



Fotografía N° 4. Distribución de la vegetación contaminada con petróleo en cada una de las parcelas.



ANEXO 7

Fotografía N^o 5. Muestras a analizar laboratorio.



Fotografía N^o 6. Análisis de Hidrocarburos Totales (TPH).



Fotografía N^o 7. Análisis de metales pesados

